

2, 6-二异丙基苯酚逆转嗅球切除抑郁模型大鼠电休克后的 Tau 蛋白过度磷酸化和认知障碍*

刘超¹⁾ 闵苏^{1)**} 魏柯¹⁾ 刘东²⁾ 董军¹⁾ 罗洁¹⁾ 刘小滨¹⁾

(¹⁾重庆医科大学附属第一医院麻醉科, 重庆 400016; ²⁾天津医科大学第二医院神经外科, 天津 300211)

摘要 通过观察 2, 6-二异丙基苯酚对电休克后嗅球切除抑郁模型大鼠学习记忆和 Tau 蛋白过度磷酸化的影响, 探讨兴奋性氨基酸受体拮抗剂对 Tau 蛋白过度磷酸化的调节及两者对抑郁大鼠学习记忆的影响, 为改善学习记忆障碍的神经心理学机制研究和临床干预性治疗提供实验依据。按随机单位组 2×2 析因设计设置 2 个干预因素, 即电休克干预(两水平: 无处置、施行一个疗程电休克)和 2, 6-二异丙基苯酚干预(两水平: 腹腔注射 5 ml 生理盐水或 5 ml 2, 6-二异丙基苯酚 100 mg/kg)的所有组合。选 24 周龄健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠建立嗅球切除抑郁模型, 将 32 只 24 周龄模型大鼠随机分为 4 个实验组($n=8$): I 组(腹腔注射 5 ml 2, 6-二异丙基苯酚 100 mg/kg)、II 组(腹腔注射 5 ml 2, 6-二异丙基苯酚 100 mg/kg + 施行电休克 1 个疗程)、III 组(腹腔注射 5 ml 生理盐水)、IV 组(腹腔注射 5 ml 生理盐水 + 施行电休克 1 个疗程)。全部电休克处置结束 24 h 内开始 Morris 水迷宫检测, 之后留取海马组织。高效液相色谱法检测神经递质谷氨酸(Glu)在海马组织中的含量; 免疫组化 SP 法和蛋白质印迹法检测 Tau-5(总 Tau 蛋白)、p-PHF1^{Ser396/404}、p-AT8^{Ser199/202}、p-12E8^{Ser202}、GSK-3 β ^{T8}和 PP-2A 在海马组织神经元中的表达。电休克和 2, 6-二异丙基苯酚均可造成大鼠学习记忆障碍, 即延长逃避潜伏期并缩短空间探索时间, 两者的影响呈相减效果。电休克可明显增加海马中神经递质谷氨酸(Glu)的浓度, 2, 6-二异丙基苯酚可降低海马中神经递质 Glu 的浓度, 且两者有相减效果。电休克和 2, 6-二异丙基苯酚对海马总 Tau 蛋白和 PP-2A 蛋白的表达无明显影响。电休克可增加海马中磷酸化 Tau 蛋白和 GSK-3 β ^{T8}蛋白的表达; 2, 6-二异丙基苯酚可减少海马中磷酸化 Tau 蛋白和 GSK-3 β ^{T8}蛋白的表达; 两者的影响均呈相减效果。实验结果表明, 电休克导致海马 Glu 浓度升高, 通过上调 GSK-3 β ^{T8}增加海马 Tau 蛋白的磷酸化程度导致学习记忆功能障碍, 而 2, 6-二异丙基苯酚则可通过降低海马 Glu 浓度下调 GSK-3 β ^{T8}的表达, 从而减缓 Tau 蛋白的磷酸化程度以改善 ECT 后的学习记忆。

关键词 2, 6-二异丙基苯酚, 电休克, 学习记忆能力, Tau 蛋白, 过度磷酸化, 糖原合成酶激酶-3 β

学科分类号 R395.1, R749.054, R614.2+4

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00483

Tau 蛋白是一种低分子质量的微管相关蛋白(microtubule associated protein, MAP)^[1], 在轴突和树突的生长点分布较为集中, 是高度不对称的磷蛋白。Tau 蛋白的主要功能是促进轴突微管的装配和稳定, 保持微管间的距离^[2], 影响神经细胞轴突的物质运输功能, 促进脑的生长发育, 抑制脂质过氧化, 提高学习记忆能力。Tau 蛋白磷酸化是调节神经元功能的主要手段^[3-4], 其磷酸化程度与神经元的可塑性有关。Tau 蛋白的磷酸化异常, 特别是微管结合区域中 Tau 蛋白位点的磷酸化, 将极大地降低 Tau 与微管的结合, 几乎所有的神经变性疾病都能发现 Tau 蛋白异常磷酸化^[5]。Tau 被异常磷酸化

后发生错误折叠^[6]、分子聚集^[7], 从而削弱其结合稳定微管的功能, 造成相关神经递质的运输、储存和释放障碍, 导致学习记忆损害^[8]。糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)是一种多功能的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶^[9], 催化 Tau 蛋白多个位点的磷酸化^[10-12], 是 Tau 蛋白过磷酸化中最为关键的蛋白激酶^[13-15]。蛋白磷酸酶 2A

* 国家自然科学基金面上资助项目(30972831)。

** 通讯联系人。

Tel/Fax: 023-89011068, E-mail: minsu89011068@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-10-26, 接受日期: 2012-03-14

(protein phosphatase 2A, PP-2A)可催化人脑 Tau 蛋白多个位点去磷酸化,使 p-Tau 恢复生物学功能^[16],从而改善学习记忆能力^[17].

电休克(electroconvulsive therapy, ECT)后可出现学习记忆功能受损,可能与病理性的谷氨酸(glutamic acid, Glu)信号系统功能异常^[18]有关,其可引起氧化应激,导致海马不加选择且泛发的长时程增强(long-term potentiation, LTP)饱和状态,造成突触可塑性障碍^[19]. Glu 及 GluR 参与了神经元的兴奋性突触传递,与运动调节、感知、学习、记忆和情感等高级神经活动有关^[20]. 但 Glu 的快速兴奋作用可引起去极化,使 Cl^- 、 Na^+ 及水内流,导致细胞渗透性溶解,并且去极化激活膜电位依赖式 GluR,使 Ca^{2+} 大量内流,细胞内 Ca^{2+} 超载,激活磷酸肌醇环路,破坏细胞的超微结构,使神经元凋亡或死亡^[21].

新近的研究^[22-23]发现 GluR 受体拮抗剂可显著抑制应激引起的磷酸化 Tau 蛋白水平的升高,证明应激可影响兴奋性神经传递系统,通过离子型兴奋性氨基酸受体和异常神经激活来调节 Tau 蛋白的磷酸化,即兴奋性神经传递系统的激活在应激诱导的海马 Tau 蛋白磷酸化中发挥作用.

2, 6-二异丙基苯酚(2, 6-diisopropylphenol, 又名二异丙酚)作用于中枢神经系统的机制与抑制 Glu 及 NMDA 受体有关,它可减弱神经系统的兴奋性毒性,从而减轻 ECT 导致的抑郁大鼠学习记忆损害^[18, 24], 2, 6-二异丙基苯酚还可通过升高蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB, 因与 v-Act 同源又称 Akt)活性抑制神经元凋亡.

那么,ECT 等应激引起的 Glu 升高是否通过上调 Tau 蛋白的过度磷酸化而造成学习记忆障碍,以及 2, 6-二异丙基苯酚是否可以阻止这一过程,成为研究者关注的焦点. 本研究通过观察 2, 6-二异丙基苯酚对 ECT 后嗅球切除抑郁模型大鼠学习记忆和 Tau 蛋白过度磷酸化的影响,探讨 2, 6-二异丙基苯酚对 Tau 蛋白过度磷酸化的调节及两者对抑郁大鼠学习记忆的影响,以期改善学习记忆障碍的神经心理学机制研究和临床干预性治疗提供实验依据.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂及仪器. 2, 6-二异丙基苯酚(英国阿斯利康公司); 色谱级纯 L-谷氨酸(L-glutamic

acid, 美国 Sigma 公司); 小鼠抗牛 Tau-5 单克隆抗体(美国 Millipore 公司); 兔抗牛 p-PHF1^{Ser396/404} 单克隆抗体(英国 Abcam 公司); 兔抗人 p-AT8^{Ser199/202} 多克隆抗体(美国 Invitrogen 公司); 兔抗人 p-12E8^{Ser262} 多克隆抗体(美国 Life Span Biosciences 公司); 小鼠抗人 GSK-3 β ^{I¹⁸⁸} 单克隆抗体(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司); 兔抗人 PP-2A 单克隆抗体(美国 Epitomics 公司); 免疫组化显色试剂盒 SP-9002 (美国 Zymed 公司); DAB 显色试剂盒(上海碧云天生物有限公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物有限公司); HPD-25D 型无油隔膜真空泵(上海鲁硕实业有限公司); YDJZ-II 型医用微型电动磨钻(上海慧恩医疗器械有限公司); Harvard 啮齿类动物电休克仪(美国自然基因有限公司); Morris 水迷宫视频分析系统(北京军事医学科学院); HPLC 色谱系统(美国 Waters 公司); 蛋白电泳系统(美国 Bio-rad 公司); 金盘多媒体图像处理系统(成都金盘电子科大多媒体技术有限公司); 光学显微照相系统(Olympus-45, 日本 Olympus 公司).

1.1.2 实验动物.

备选 24 周龄健康雄性 SD(Sprague-Dawley)大鼠, 体重 250~300 g, 由天津医科大学实验动物科学部提供. 将实验用大鼠置于通风良好, 12 h 明暗交替, 自由饮水摄食条件下, 每日触摸 2 min, 使大鼠适应实验室环境及实验人员操作.

适应性饲养一周后, 建立大鼠嗅球切除抑郁模型^[25-26]: 2.75% 戊巴比妥钠(55 mg/kg, 2 ml/kg, 腹腔注射)麻醉大鼠, 在两耳连线中点处将皮肤切开, 暴露颅骨, 在距前凶前 7~8 mm, 与正中缝两侧旁开 2 mm 的交点处, 用电动磨钻将颅骨钻两个直径 2 mm 的小孔, 用探针搅动破坏全部嗅球, 用真空泵将破坏的嗅球组织吸出, 吸收性明胶海绵填入小孔止血. 青霉素溶液(20×10^4 U/ml)冲洗手术切口, 缝合皮肤, 并肌注青霉素钠 4×10^4 U/只, 连续给药 3 天, 以防术后感染.

术后每天对大鼠抚摸和称重, 恢复两周后进行旷场实验(open field test), 每次测试均于上午 9 时开始, 选取测试总分 30~90 分之间的 32 只大鼠.

1.2 方法

1.2.1 动物实验原则. 实验方案经重庆医科大学医学伦理委员会和重庆医科大学附属第一医院医学伦理委员会批准施行. 所有动物实验均按照美国医学研究协会《实验动物处理原则》以及美国科学学会和

美国国立卫生研究院《实验动物使用和处理指南》进行。所有测试和检测均遵循双盲原则。所有大鼠在整个实验中均行孤笼饲养。

1.2.2 实验动物分组. 在实验组内采用随机单位析因设计: 将每只大鼠视为 1 个单位, 是对每个单位两个处理因素, 即 ECT 处置与否(两水平: 无处置、施行一个疗程 ECT)和静脉全麻药 2, 6-二异丙基苯酚使用与否(两水平: 腹腔注射 5 ml 生理盐水、腹腔注射 5 ml 2, 6-二异丙基苯酚 100 mg/kg)的所有组合(2×2 析因设计, 共 4 组)进行的实验设计研究。

1.2.3 实验动物干预措施. 通过随机数字发生器将 32 只嗅球切除抑郁模型大鼠随机分为 4 个实验组($n=8$): I 组(腹腔注射 5 ml 2, 6-二异丙基苯酚 100 mg/kg)、II 组(腹腔注射 5 ml 2, 6-二异丙基苯酚 100 mg/kg + 施行 ECT 1 个疗程)、III 组(腹腔注射 5 ml 生理盐水)、IV 组(腹腔注射 5 ml 生理盐水 + 施行 ECT 1 个疗程)。

1.2.4 ECT 处置. 每次施行 ECT 前 15 min 腹腔注射每组相应药物, 然后于大鼠双侧侧安放电极, 采用 Harvard 啮齿类动物电休克仪行 ECT 处理, 给予方波(单个正弦半波 20 ms, 50 Hz), 电流 50 mA, 频率 50 Hz, 持续 1 s 的电刺激, 引起大鼠强直阵挛抽搐发作为治疗成功^[7], 隔天 1 次, 共 7 次, 均于上午 9 时开始进行。不施行 ECT 处置的实验组(I 组、III 组)在同样的时间以同样的频率和剂量注射相应药物。

1.2.5 Morris 水迷宫视频分析系统检测实验大鼠的学习记忆功能.

全部 ECT 处置结束 24 h 内开始 Morris 水迷宫检测。Morris 水迷宫被均分为 I、II、III、IV 4 个象限。训练前, 水迷宫内盛自来水, 加墨汁使水浑浊, 检测前将平台置于 I 象限水面下 2 cm。所有实验均在上午 9 时到下午 3 时之间进行, 且保持室内安静, 物品放置及灯光状态一致, 水温(24 ± 1)℃。Morris1.0 软件可以跟踪并记录分析相关数据。

第 1~6 天进行定位航行实验: 按逆时针方向分别从 I、II、III、IV 4 个象限将大鼠面向池壁放入水中, 观察并计时 120 s, 检测前将平台置于 I 象限正中水面下 2 cm。摄像系统记录大鼠寻找并爬上平台的时间为逃避潜伏期(escape latency, EL), 若 120 s 内还未找到平台, 则引导其至平台, 停留 30 s, 逃避潜伏期记为 120 s。检测结束后以第 1~6 天逃避潜伏期的平均值作为学习成绩, 该

时间越短显示大鼠的学习能力越好。

第 7 天进行空间探索实验: 撤除平台, 将大鼠从距原平台最远的 III 象限面向池壁放入水中, 摄像系统记录大鼠在 60 s 内各象限游泳时间, 以在原平台象限 I 象限游泳时间即空间探索时间(space exploration time, SET)作为记忆成绩, 该时间越长显示大鼠的记忆能力越好。

1.2.6 取材.

在 Morris 水迷宫测试结束后 6 h 内取实验大鼠的海马组织, 大鼠取材前禁食不禁水, 腹腔注射 1.5 g/kg 20% 氨基甲酸乙酯麻醉后, 快速断头开颅取全脑组织。在去 DEPC 水制成的冰面上吸除血迹, 分离双侧海马组织。

大鼠左侧海马均分为 A、B 两份: A 份用锡铂纸标记包裹后置于液氮中过夜, 然后保存于 -80℃ 超低温冰箱中, 备做 Western blotting; B 份称重, 加入 1 ml 甲醇-水离心液, 低温匀浆, 取部分匀浆液 4℃, 10 000 g, 离心 15 min, 取上清, 滤膜过滤后 -80℃ 保存待测 Glu 的含量。大鼠右侧海马置于 4℃ 的 10% 多聚甲醛中固定 3 天, 脱水、石蜡包埋、切片(厚度 1 μ m), 备行免疫组化 SP 法显色。

1.2.7 高效液相色谱法检测神经递质 Glu 在大鼠海马中的含量.

检测样品: 处理好的为 B 份大鼠左侧海马组织匀浆上清液。

试剂: Glu 标准品: OPA(国产分析纯, 上海碧云天生物有限公司), β -巯基乙醇(美国 Amresco 公司), 甲醇(色谱级, 上海碧云天生物有限公司)。

仪器及色谱条件: Centrifuge 5810R 型低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司); HPLC 色谱系统(美国 Waters 公司), 包括 600 泵、荧光 2475 检测器、Empower 色谱工作站; 18-ODS 色谱柱(美国 Dima 公司), 柱温 35℃。流动相 A: 0.1 mol/L 醋酸钾。流动相 B: 甲醇, 进行二元梯度洗脱, 梯度洗脱程序(T , B%): (0 min, 45%), (1 min, 65%), (6 min, 75%), (20 min, 45%), T 指时间, B% 指 B 流动相所占的比例。流动相经 0.45 μ m 微孔滤膜过滤, 超声脱气。流速 1.0 ml/min、激发波长 250 nm, 发射波长 410 nm, 以 Glu 峰面积定量。

衍生化试剂的配制: 将 20 mg OPA 溶于 500 μ l 甲醇中, 超声溶解, 加入 β -巯基乙醇 500 μ l, 再加入 9 ml pH 10.0 的硼酸缓冲液, 避光密封后 0~4℃ 保存。

氨基酸标准液的配制: Glu 标准品配成

100 $\mu\text{mol/L}$ 的标准溶液, 测前稀释.

衍生及分析: 取 100 μl 标准液或组织样品液置 EP 管中, 加 100 μl 衍生化试剂反应 2 min 后进样 20 μl .

Glu 标准曲线的建立: 配制浓度分别为 0.15、0.30、0.735、1.47、2.94、3.675、5.88 mg/L 的 Glu 标准溶液, 衍生化处理后测定. 应用外标法进行定量分析, 以其峰面积(Y)对其浓度(X)进行直线回归, 得到线性方程.

海马中 Glu 含量的测定: 对海马组织匀浆上清液解冻, 置入玻璃匀浆器, 加入冰冻的甲酸 (1 mol/L, 2 ml), 冰浴下手动充分匀浆. 将匀浆液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 7 000 r/min 离心 30 min. 取上清液置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用. 每 1 ml 脑组织匀浆上清液加 0.75 ml 4%碳酸氢钠溶液混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 3000 r/min 离心 5 min, 取上清液过 0.45 μm 滤膜, 分装. 然后取该分装液 24 μl , 在进样瓶中加入衍生试剂 12 μl , 四硼酸钠缓冲液(pH 9.18) 960 μl , 混匀, 温度控制在 20 $^{\circ}\text{C}$ 下静置 3 min 后依次进样, 梯度洗脱, 分别测定 Glu 含量.

1.2.8 免疫组织化学 SP 法检测 Tau-5(总 Tau 蛋白)、p-PHF1^{Ser396/404}、p-AT8^{Ser199/202}、p-12E8^{Ser262}、GSK-3 β ^{I H} 和 PP-2A 蛋白在大鼠海马中的表达.

海马组织石蜡切片常规脱蜡、乙醇水化、蒸馏水冲洗, 0.01 mol/L PBS 浸泡 5 min, 3% H_2O_2 浸泡 15 min, 置 0.01 mol/L 枸橼酸缓冲液(pH 6.0)中煮沸 15~20 min 进行抗原修复, 室温冷却 20 min, 10%山羊血清白蛋白孵育 15 min, 分别加入 50 μl 相应抗体(小鼠抗牛 Tau-5 单克隆抗体、兔抗牛 p-PHF1^{Ser396/404} 单克隆抗体、兔抗人 p-AT8^{Ser199/202} 多克隆抗体、兔抗人 p-12E8^{Ser262} 多克隆抗体、小鼠抗人 GSK-3 β ^{I H} 单克隆抗体、兔抗人 PP-2A 单克隆抗体(1:400)) 50 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 加入相应生物素标记 IgG 工作液 50 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 25 min, 加入辣根酶标记链霉卵白素工作液 50 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 25 min, 滴加 DAB 显色液显色 5 min, 0.01 mol/L PBS 冲洗, 然后苏木精复染、脱水、透明、中性树脂封片并拍照分析. 阴性对照以 0.01 mol/L PBS 替代一抗. 每只大鼠随机取 10 张切片, 光镜下(400 倍)随机选 10 个视野, 进行阳性细胞计数, 阳性反应产物呈黄褐色. 采用成都金盘多媒体图像处理系统测定阳性细胞积分吸光度值, 积分吸光度值与蛋白质的表达水平成正比.

1.2.9 Western blotting 检测 Tau-5(总 Tau 蛋白)、

p-PHF1^{Ser396/404}、p-AT8^{Ser199/202}、p-12E8^{Ser262}、GSK-3 β ^{I H} 和 PP-2A 蛋白在大鼠海马中的含量.

取 A 份大鼠左侧海马组织, 匀浆, 取 0.2 g, 经 Western 及 IP 细胞裂解液提取蛋白质, 再用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白质浓度, 据此调节蛋白质浓度一致. 取等量蛋白质样品, 用 5 $\times$ SDS 加样缓冲液按 1:1(v/v)稀释待测样品, 于 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 5 min; 另用 1 $\times$ SDS 加样缓冲液溶解预染蛋白质分子质量标准混合物, 于 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 3 min. 取待测标本 15 μl 上样(甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GRPDH)作为蛋白质上样量的标定), 经 SDS-PAGE 至预染蛋白质分子质量标准所示目的分子质量出现为止, 用湿法将蛋白质条带电转至 Immun-blot PVDF 膜, 50 g/L 脱脂奶粉封闭 3 h, 分别加入 50 μl 相应抗体(小鼠抗牛 Tau-5 单克隆抗体、兔抗牛 p-PHF1^{Ser396/404} 单克隆抗体、兔抗人 p-AT8^{Ser199/202} 多克隆抗体、兔抗人 p-12E8^{Ser262} 多克隆抗体、小鼠抗人 GSK-3 β ^{I H} 单克隆抗体、兔抗人 PP-2A 单克隆抗体(1:200)), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 使用相应辣根酶标记 IgG(1:200)37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 采用 DAB 试剂盒显色, 采用金盘多媒体图像处理系统测定阳性条带的积分吸光度值.

1.3 统计学分析

计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS17.0 统计软件对各组样本进行方差齐性检验, 经检验方差齐. 将各组样本进行析因设计单因素方差分析各处理因素主效应和交互效应; 采用单因素方差分析方法分析各处理因素单独效应; 行 LSD 检验和 SNK-q 检验两两比较. $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 示差异有统计学意义.

2 结 果

2.1 Morris 水迷宫视频分析系统检测实验大鼠的学习记忆功能: 逃避潜伏期、空间探索时间

ECT 和 2, 6- 二异丙基苯酚均可以造成大鼠学习记忆障碍, 即延长逃避潜伏期(ECT: $F=6.796$, $P=0.014$; 2, 6- 二异丙基苯酚: $F=13.348$, $P=0.001$) 并缩短空间探索时间(ECT: $F=14.555$, $P=0.001$; 2, 6- 二异丙基苯酚: $F=10.997$, $P=0.003$); 但两者的影响呈相减效果(逃避潜伏期: $F=141.805$, $P=0.000$; 空间探索时间: $F=92.049$, $P=0.000$), 即 ECT 和 2, 6- 二异丙基苯酚合用之后, 其造成的大鼠学习记忆障碍程度反而减轻(表 1、2, 图 1).

Table 1 Morris water maze test: escape latency (EL)					($\bar{x} \pm s, n=8$)
Groups	Saline	2,6-Diisopropylphenol	Sum	<i>F</i>	<i>P</i>
No intervention	27.76±4.76	89.23±16.18	58.00±34.25	109.793	0.000
ECT	85.03±12.08	51.89±9.24	68.46±20.02	37.975	0.000
Sum	55.90±31.37	70.56±23.10	63.23±28.10	13.348*	0.001*
<i>F</i>	161.083	32.137	6.796*		
<i>P</i>	0.000	0.000	0.014*	(<i>F</i> =141.805, <i>P</i> =0.000) [#]	

**F* statistic and *P* value of main effect; [#]*F* statistic and *P* value of crossover effect.

Table 2 Morris water maze test: space exploration time (SET)					($\bar{x} \pm s, n=8$)
Groups	Saline	2,6-Diisopropylphenol	Sum	<i>F</i>	<i>P</i>
No intervention	29.10±5.72	12.67±2.04	20.89±9.45	58.633	0.000
ECT	12.03±1.96	20.03±3.34	16.03±4.90	34.059	0.000
Sum	20.57±9.73	16.35±4.65	18.46±7.80	10.997*	0.003*
<i>F</i>	63.802	28.262	14.555*		
<i>P</i>	0.000	0.000	0.001*	(<i>F</i> =92.049, <i>P</i> =0.000) [#]	

**F* statistic and *P* value of main effect; [#]*F* statistic and *P* value of crossover effect.

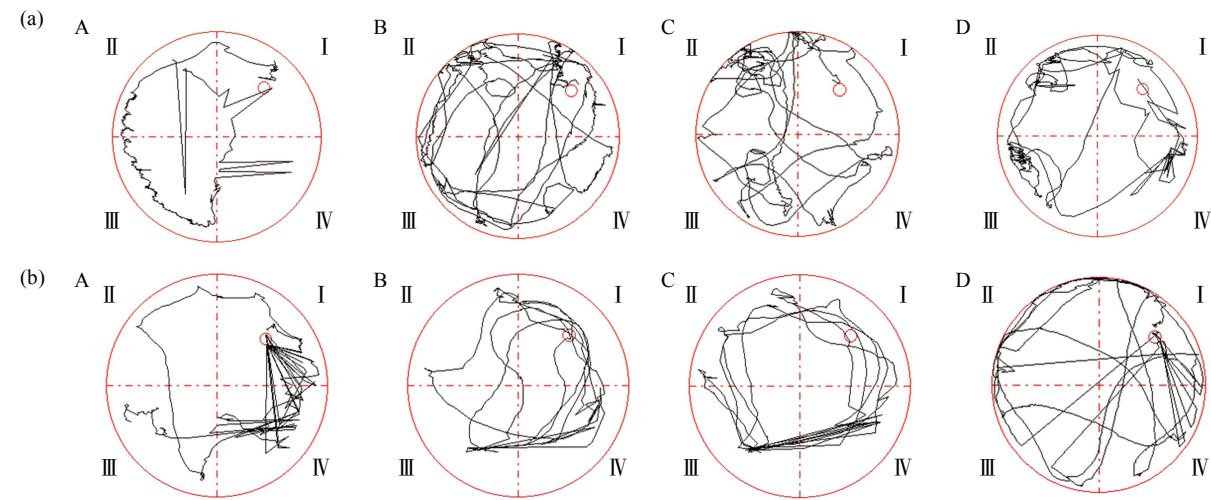


Fig. 1 The trajectory path of rats in the positioning navigation experiment (a) and the space exploration experiment (b)
A: Corresponding to 5 ml Saline was injected peritoneally in the depression model rats whose olfactory bulbs were removed; B: Corresponding to 5 ml 2, 6-diisopropylphenol was injected peritoneally in the depression model rats whose olfactory bulbs were removed by dosage of 100 mg/kg; C: Corresponding to 5 ml Saline was injected peritoneally in the depression model rats whose olfactory bulbs were removed and giving a course of electroconvulsive shock; D: Corresponding to 5 ml 2, 6-diisopropylphenol was injected peritoneally in the depression model rats whose olfactory bulbs were removed by dosage of 100 mg/kg and giving a course of electroconvulsive shock.

2.2 高效液相色谱法检测神经递质 Glu 在大鼠海马中的含量
ECT 可明显增加海马中神经递质 Glu 的浓度 (*F*=128.620, *P*=0.000); 2, 6- 二异丙基苯酚可减少海马中神经递质 Glu 的浓度(*F*=21.580, *P*=0.000); ECT 和 Glu 受体阻滞剂存在相减效应(*F*=4.393, *P*=0.045, 表 3).

Table 3 The content of glutamate in the hippocampus of rats($\mu\text{mol/g}$, $\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Groups	Saline	2, 6-Diisopropylphenol	Sum	<i>F</i>	<i>P</i>
No intervention	55.68±9.10	41.55±8.84	48.62±11.33	9.926	0.007
ECT	130.17±23.10	92.80±17.00	111.48±27.50	13.586	0.002
Sum	92.93±42.04	67.17±29.52	80.50±38.05	21.580*	0.000*
<i>F</i>	72.021	57.248	128.620*		
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000*	(F=4.393, P=0.045) [#]	

* *F* statistic and *P* value of main effect; [#] *F* statistic and *P* value of crossover effect.

2.3 免疫组织化学 SP 法检测 Tau-5 (总 Tau 蛋白)、p-PHF1^{Ser396/404}、p-AT8^{Ser199/202}、p-12E8^{Ser262}、GSK-3 β ^{IH8} 和 PP-2A 蛋白在大鼠海马中的表达

ECT 和 2, 6- 二异丙基苯酚对海马总 Tau 蛋白 (Tau-5 蛋白) 的表达均无明确影响. Tau-5-IR 阳性细胞的数目: ECT, $F=1.032$, $P=0.318$; 2, 6- 二异丙基苯酚, $F=0.069$, $P=0.794$. Tau-5-IR 阳性细胞的积分吸光度值: ECT, $F=0.299$, $P=0.589$; 2, 6- 二异丙基苯酚, $F=0.032$, $P=0.859$. ECT 和 2, 6- 二异丙基苯酚亦未见交互效应 (Tau-5-IR 阳性细胞的数目: $F=0.032$, $P=0.859$, Tau-5-IR 阳性细胞的积分吸光度值: $F=0.001$, $P=0.981$, 图 2a, 表 4、5).

ECT 可增加海马中磷酸化 Tau 蛋白的表达. IR 阳性细胞的数目: p-PHF1^{Ser396/404}, $F=170.167$, $P=0.000$; p-AT8^{Ser199/202}, $F=225.129$, $P=0.000$;

p-12E8^{Ser262}, $F=143.074$, $P=0.000$. IR 阳性细胞的积分吸光度值: p-PHF1^{Ser396/404}, $F=82.325$, $P=0.000$; p-AT8^{Ser199/202}, $F=164.386$, $P=0.000$; p-12E8^{Ser262}, $F=171.371$, $P=0.000$.

2, 6- 二异丙基苯酚可减少海马中磷酸化 Tau 蛋白的表达. IR 阳性细胞的数目: p-PHF1^{Ser396/404}, $F=245.041$, $P=0.000$; p-AT8^{Ser199/202}, $F=108.476$, $P=0.000$; p-12E8^{Ser262}, $F=74.025$, $P=0.000$. IR 阳性细胞的积分吸光度值: p-PHF1^{Ser396/404}, $F=281.962$, $P=0.000$; p-AT8^{Ser199/202}, $F=193.046$, $P=0.000$; p-12E8^{Ser262}, $F=232.275$, $P=0.000$.

ECT 和 2, 6- 二异丙基苯酚对磷酸化 Tau 蛋白表达的影响呈相减效果. IR 阳性细胞的数目: p-PHF1^{Ser396/404}, $F=19.211$, $P=0.000$; p-AT8^{Ser199/202}, $F=8.749$, $P=0.006$; p-12E8^{Ser262}, $F=19.952$, $P=0.000$.

Table 4 The quantity of positive cells in the hippocampus of rats (Tau-5-IR)($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Groups	Saline	2, 6-Diisopropylphenol	Sum	<i>F</i>	<i>P</i>
No intervention	197.75±36.36	196.63±38.62	197.18±36.24	0.004	0.953
ECT	213.63±39.73	207.75±35.52	210.69±36.53	0.097	0.760
Sum	205.69±37.69	202.18±36.30	203.94±36.44	0.069*	0.794*
<i>F</i>	0.695	0.360	1.032*		
<i>P</i>	0.418	0.558	0.318*	(F=0.032, P=0.859) [#]	

* *F* statistic and *P* value of main effect; [#] *F* statistic and *P* value of crossover effect.**Table 5 The integral absorbance value of positive cells in the hippocampus of rats (Tau-5-IR)**($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Groups	Saline	2, 6-Diisopropylphenol	Sum	<i>F</i>	<i>P</i>
No intervention	0.6765±0.1091	0.6693±0.0991	0.6729±0.1008	0.019	0.892
ECT	0.6951±0.1090	0.6895±0.0829	0.6923±0.0935	0.013	0.911
Sum	0.6858±0.1057	0.6793±0.0889	0.6826±0.0961	0.032*	0.859*
<i>F</i>	0.116	0.197	0.299*		
<i>P</i>	0.738	0.664	0.589*	(F=0.001, P=0.981) [#]	

* *F* statistic and *P* value of main effect; [#] *F* statistic and *P* value of crossover effect.

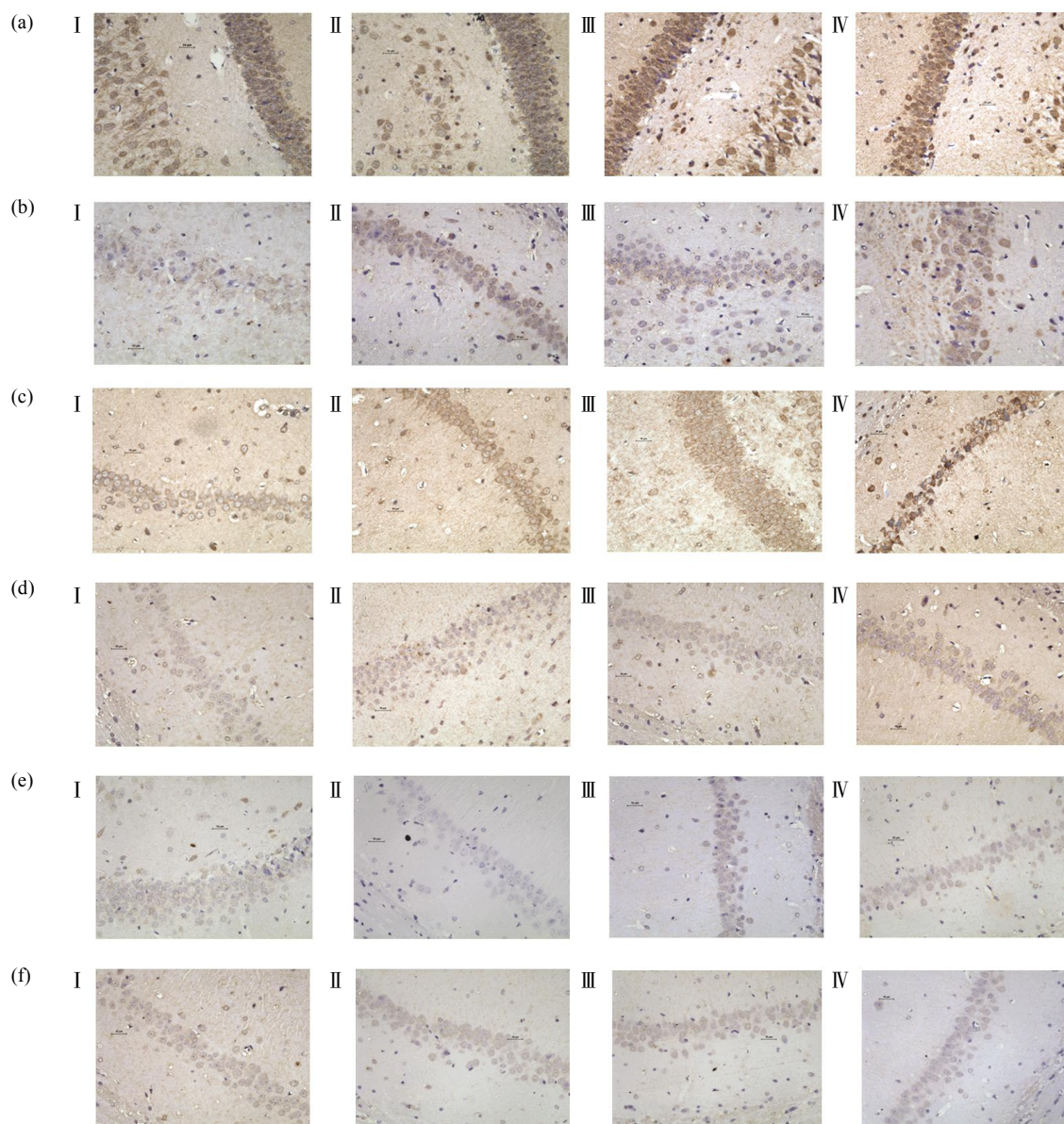


Fig. 2 The expression of Tau-5-IR(a), p-PHF1^{Ser396/404}-IR(b), p-AT8^{Ser199/202}-IR(c), p-12E8^{Ser262}-IR(d), GSK-3β^{I18}-IR(e) and PP-2A-IR(f) in the hippocampus of rats (IHC, SP)

I : Corresponding to 5 ml 2,6-diisopropylphenol was injected peritoneally in the depression model rats whose olfactory bulbs were removed by dosage of 100 mg/kg; II : Corresponding to 5 ml 2,6-diisopropylphenol was injected peritoneally in the depression model rats whose olfactory bulbs were removed by dosage of 100 mg/kg and giving a course of electroconvulsive shock; III : Corresponding to 5 ml Saline was injected peritoneally in the depression model rats whose olfactory bulbs were removed; IV : Corresponding to 5 ml Saline was injected peritoneally in the depression model rats whose olfactory bulbs were removed and giving a course of electroconvulsive shock.

IR 阳性细胞的积分吸光度值: p-PHF1^{Ser396/404}, $F=8.928$, $P=0.006$; p-AT8^{Ser199/202}, $F=32.623$, $P=0.000$; p-12E8^{Ser262}, $F=17.419$, $P=0.000$. 2, 6-二异丙基苯酚可使 ECT 造成的海马中磷酸化 Tau 蛋白的表达增加的幅度减缓(图 2b~d, 表 6~11).

ECT 可增加海马中 GSK-3β^{I18} 蛋白的表达: GSK-3β^{I18}-IR 阳性细胞的数目($F=26.625$, $P=0.000$), GSK-3β^{I18}-IR 阳性细胞的积分吸光度值($F=56.671$,

$P=0.000$). 而 2, 6-二异丙基苯酚可减少海马中 GSK-3β^{I18} 蛋白的表达: IR 阳性细胞的数目($F=67.421$, $P=0.000$), IR 阳性细胞的积分吸光度值($F=84.442$, $P=0.000$). 两者的影响呈相减效果, IR 阳性细胞的数目($F=5.655$, $P=0.024$), IR 阳性细胞的积分吸光度值($F=4.756$, $P=0.038$), 即 2, 6-二异丙基苯酚可使 ECT 造成海马中磷酸化 Tau 蛋白的表达增加的幅度减缓(图 2e, 表 12、13).

Table 6 The quantity of positive cells in the hippocampus of rats (p-PHF1^{Ser 396/404}-IR) $(\bar{x} \pm s, n=8)$

Groups	Saline	2, 6-Diisopropylphenol	Sum	<i>F</i>	<i>P</i>
No intervention	44.38±4.14	17.38±3.11	30.88±14.38	217.438	0.000
ECT	86.13±11.80	38.13±4.19	62.13±26.22	117.535	0.000
Sum	65.25±23.19	27.75±11.29	46.50±26.17	245.041*	0.000*
<i>F</i>	89.163	126.404	170.167*		
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000*	(F=19.211, P=0.000) [#]	

* *F* statistic and *P* value of main effect; [#] *F* statistic and *P* value of crossover effect.**Table 7 The integral absorbance value of positive cells in the hippocampus of rats (p-PHF1^{Ser 396/404}-IR)** $(\bar{x} \pm s, n=8)$

Groups	Saline	2, 6-Diisopropylphenol	Sum	<i>F</i>	<i>P</i>
No intervention	0.1246±0.0126	0.0663±0.0071	0.0955±0.0317	131.323	0.000
ECT	0.1756±0.0178	0.0920±0.0069	0.1338±0.0451	153.483	0.000
Sum	0.1501±0.0302	0.0791±0.0149	0.1146±0.0430	281.962*	0.000*
<i>F</i>	43.674	55.348	82.325*		
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000*	(F=8.928, P=0.006) [#]	

* *F* statistic and *P* value of main effect; [#] *F* statistic and *P* value of crossover effect.**Table 8 The quantity of positive cells in the hippocampus of rats (p-AT8^{Ser199/202}-IR)** $(\bar{x} \pm s, n=8)$

Groups	Saline	2, 6-Diisopropylphenol	Sum	<i>F</i>	<i>P</i>
No intervention	52.50±8.23	26.50±4.90	39.50±14.94	58.966	0.000
ECT	115.13±13.81	68.50±10.32	91.81±26.80	58.503	0.000
Sum	83.81±34.15	47.50±23.06	65.66±34.08	108.476*	0.000*
<i>F</i>	121.416	108.079	225.129*		
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000*	(F=8.749, P=0.006) [#]	

* *F* statistic and *P* value of main effect; [#] *F* statistic and *P* value of crossover effect.**Table 9 The integral absorbance value of positive cells in the hippocampus of rats (p-AT8^{Ser199/202}-IR)** $(\bar{x} \pm s, n=8)$

Groups	Saline	2, 6-Diisopropylphenol	Sum	<i>F</i>	<i>P</i>
No intervention	0.1908±0.0099	0.0772±0.0120	0.1341±0.0596	426.061	0.000
ECT	0.4480±0.0729	0.1759±0.0246	0.3120±0.1500	100.026	0.000
Sum	0.3194±0.1420	0.1266±0.0543	0.2230±0.1441	193.046*	0.000*
<i>F</i>	97.786	103.682	164.386*		
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000*	(F=32.623, P=0.000) [#]	

* *F* statistic and *P* value of main effect; [#] *F* statistic and *P* value of crossover effect.**Table 10 The quantity of positive cells in the hippocampus of rats (p-12E8^{Ser262}-IR)** $(\bar{x} \pm s, n=8)$

Groups	Saline	2, 6-Diisopropylphenol	Sum	<i>F</i>	<i>P</i>
No intervention	27.13±5.28	18.50±2.62	22.81±6.00	17.152	0.001
ECT	61.38±8.09	34.13±6.24	47.75±15.71	56.905	0.000
Sum	44.25±18.88	26.31±9.30	35.28±17.24	74.025*	0.000*
<i>F</i>	100.638	42.608	143.074*		
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000*	(F=19.952, P=0.000) [#]	

* *F* statistic and *P* value of main effect; [#] *F* statistic and *P* value of crossover effect.

Table 11 The integral absorbance value of positive cells in the hippocampus of rats(p-12E8^{Scr262}-IR) ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Groups	Saline	2, 6-Diisopropylphenol	Sum	<i>F</i>	<i>P</i>
No intervention	0.0902±0.0100	0.0490±0.0073	0.0696±0.0229	89.345	0.000
ECT	0.1541±0.0271	0.0822±0.0139	0.1181±0.0425	44.545	0.000
Sum	0.1222±0.0384	0.0656±0.0202	0.0939±0.0417	232.275*	0.000*
<i>F</i>	39.071	36.062	171.371*		
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000*	(F=17.419, P=0.000) [#]	

* *F* statistic and *P* value of main effect; [#] *F* statistic and *P* value of crossover effect.**Table 12 The quantity of positive cells in the hippocampus of rats (GSK-3β^{IR}-IR)** ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Groups	Saline	2, 6-Diisopropylphenol	Sum	<i>F</i>	<i>P</i>
No intervention	70.13±9.36	53.88±6.17	62.00±11.36	16.809	0.001
ECT	91.13±8.41	61.63±7.21	76.38±17.01	56.750	0.000
Sum	80.63±13.84	57.75±7.62	69.19±15.99	67.421*	0.000*
<i>F</i>	22.294	5.333	26.625*		
<i>P</i>	0.000	0.037	0.000*	(F=5.655, P=0.024) [#]	

* *F* statistic and *P* value of main effect; [#] *F* statistic and *P* value of crossover effect.**Table 13 The integral absorbance value of positive cells in the hippocampus of rats(GSK-3β^{IR}-IR)** ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Groups	Saline	2, 6-Diisopropylphenol	Sum	<i>F</i>	<i>P</i>
No intervention	0.1959±0.0339	0.1219±0.0257	0.1589±0.0480	24.229	0.000
ECT	0.2971±0.0286	0.1770±0.0307	0.2370±0.0684	65.532	0.000
Sum	0.2465±0.0604	0.1494±0.0395	0.1980±0.0704	84.442*	0.000*
<i>F</i>	41.532	15.160	56.671*		
<i>P</i>	0.000	0.002	0.000*	(F=4.756, P=0.038) [#]	

* *F* statistic and *P* value of main effect; [#] *F* statistic and *P* value of crossover effect.

ECT 和 2, 6- 二异丙基苯酚对海马 PP-2A 蛋白的表达均无明确影响: PP-2A-IR 阳性细胞数目 (ECT: $F=0.942$, $P=0.340$, 2, 6- 二异丙基苯酚: $F=1.620$, $P=0.214$), PP-2A-IR 阳性细胞的积分吸光度值 (ECT: $F=2.795$, $P=0.106$, 2, 6- 二异丙基苯

酚: $F=3.344$, $P=0.078$). ECT 和 2, 6- 二异丙基苯酚亦未见交互效应 (PP-2A-IR 阳性细胞数目: $F=0.070$, $P=0.793$, PP-2A-IR 阳性细胞的积分吸光度值: $F=0.117$, $P=0.735$, 图 2f, 表 14、15).

Table 14 The quantity of positive cells in the hippocampus of rats (PP-2A-IR) ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Groups	Saline	2, 6-Diisopropylphenol	Sum	<i>F</i>	<i>P</i>
No intervention	70.75±13.36	78.38±15.09	74.56±14.32	1.145	0.303
ECT	67.25±13.26	72.25±14.31	69.75±13.58	0.525	0.481
Sum	69.00±12.99	75.31±14.55	72.16±13.94	1.620*	0.214*
<i>F</i>	0.277	0.694	0.942*		
<i>P</i>	0.607	0.419	0.340*	(F=0.070, P=0.793) [#]	

* *F* statistic and *P* value of main effect; [#] *F* statistic and *P* value of crossover effect.

Table 15 The integral absorbance value of positive cells in the hippocampus of rats (PP-2A-IR) ($\bar{x} \pm s, n=8$)

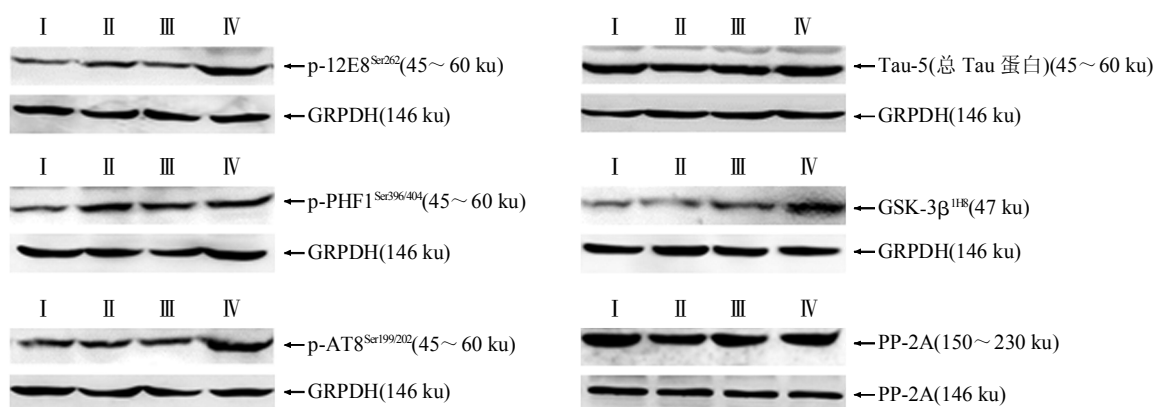
Groups	Saline	2, 6-Diisopropylphenol	Sum	<i>F</i>	<i>P</i>
No intervention	0.1781±0.0350	0.2057±0.0415	0.1919±0.0397	2.054	0.174
ECT	0.1613±0.0392	0.1802±0.0255	0.1707±0.0334	1.295	0.274
Sum	0.1697±0.0369	0.1929±0.0358	0.1813±0.0377	3.344*	0.078*
<i>F</i>	0.821	2.194	2.795*		
<i>P</i>	0.380	0.161	0.106*	(F=0.117, P=0.735) [#]	

* *F* statistic and *P* value of main effect; [#] *F* statistic and *P* value of crossover effect.

2.4 Western blotting 检测 Tau-5 (总 Tau 蛋白)、p-PHF1^{Ser396/404}、p-AT8^{Ser199/202}、p-12E8^{Ser262}、GSK-3β^{IH8} 和 PP-2A 蛋白在大鼠海马组织神经元中的含量

ECT 和 2, 6- 二异丙基苯酚对海马总 Tau 蛋白

(Tau-5 蛋白)的表达均无明确影响(ECT: *F*=0.594, *P*=0.448, 2, 6- 二异丙基苯酚: *F*=0.216, *P*=0.646), 而且 ECT 和 2, 6- 二异丙基苯酚亦未见交互效应(*F*=0.077, *P*=0.783, 图 3, 表 16).

**Fig. 3 The content of Tau and GSK-3β^{IH8} protein in the hippocampus of rats (Western blotting) ($\bar{x} \pm s, n=8$)**

I : Corresponding to 5 ml 2, 6-diisopropylphenol was injected peritoneally in the depression model rats whose olfactory bulbs were removed by dosage of 100 mg/kg. II : Corresponding to 5 ml 2, 6-diisopropylphenol was injected peritoneally in the depression model rats whose olfactory bulbs were removed by dosage of 100 mg/kg and giving a course of electroconvulsive shock. III : Corresponding to 5 ml Saline was injected peritoneally in the depression model rats whose olfactory bulbs were removed. IV : Corresponding to 5 ml Saline was injected peritoneally in the depression model rats whose olfactory bulbs were removed and giving a course of electroconvulsive shock.

Table 16 The expression of Tau-5 protein in the hippocampus of rats (WB, Integral absorbance value) ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Groups	Saline	2, 6-Diisopropylphenol	Sum	<i>F</i>	<i>P</i>
No intervention	1481.63±272.33	1463.13±253.01	1472.38±254.11	0.020	0.890
ECT	1585.50±308.47	1511.88±283.96	1548.69±288.93	0.247	0.627
Sum	1533.56±286.17	1487.50±261.03	1510.53±270.45	0.216*	0.646*
<i>F</i>	0.510	0.131	0.594*		
<i>P</i>	0.487	0.722	0.448*	(F=0.077, P=0.783) [#]	

* *F* statistic and *P* value of main effect; [#] *F* statistic and *P* value of crossover effect.

ECT 可增加海马中磷酸化 Tau 蛋白的表达 (p-PHF1^{Ser396/404}: *F*=26.731, *P*=0.000; p-AT8^{Ser199/202}: *F*=103.235, *P*=0.000; p-12E8^{Ser262}: *F*=39.835, *P*=

0.000). 2, 6- 二异丙基苯酚可减少海马中磷酸化 Tau 蛋白的表达(p-PHF1^{Ser396/404}: *F*=52.492, *P*=0.000; p-AT8^{Ser199/202}: *F*=61.657, *P*=0.000; p-12E8^{Ser262}:

$F=28.085$, $P=0.000$). 两者的影响呈相减效果, (p-PHF1^{Ser396/404}: $F=5.429$, $P=0.027$; p-AT8^{Ser199/202}: $F=34.421$, $P=0.000$; p-12E8^{Ser262}: $F=4.921$, $P=0.035$), 即 2, 6-二异丙基苯酚可使 ECT 造成的海马中磷酸化 Tau 蛋白表达增加的幅度减缓(图 9, 表 17 至 19).

ECT 可增加海马中 GSK-3 β ^{IH8} 蛋白的表达 ($F=133.770$, $P=0.000$); 2, 6-二异丙基苯酚可减少海马中磷酸化 Tau 蛋白的表达($F=71.517$, $P=0.000$); 两者的影响呈相减效果($F=4.277$, $P=0.048$), 即 2, 6-二异丙基苯酚可使 ECT 造成的海马中磷酸化 Tau 蛋白表达增加的幅度减缓(图 3, 表 20).

Table 17 The expression of p-PHF1^{Ser396/404} protein in the hippocampus of rats(WB, Integral absorbance value) ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Groups	Saline	2, 6-Diisopropylphenol	Sum	F	P
No intervention	245.00 $\pm$ 44.81	172.75 $\pm$ 18.20	208.88 $\pm$ 49.83	17.856	0.001
ECT	355.25 $\pm$ 51.17	214.50 $\pm$ 44.24	284.88 $\pm$ 86.13	34.637	0.000
Sum	300.13 $\pm$ 74.49	193.63 $\pm$ 39.15	246.88 $\pm$ 79.26	52.492*	0.000*
F	21.019	6.094	26.731*		
P	0.000	0.027	0.000*	(F=5.429, P=0.027) [#]	

* F statistic and P value of main effect; [#] F statistic and P value of crossover effect.

Table 18 The expression of p-AT8^{Ser199/202} protein in the hippocampus of rats(WB, Integral absorbance value) ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Groups	Saline	2, 6-Diisopropylphenol	Sum	F	P
No intervention	321.88 $\pm$ 37.35	267.50 $\pm$ 43.20	294.69 $\pm$ 48.07	7.252	0.017
ECT	873.88 $\pm$ 171.09	401.38 $\pm$ 70.18	637.63 $\pm$ 274.76	52.230	0.000
Sum	597.88 $\pm$ 309.14	334.44 $\pm$ 89.16	466.16 $\pm$ 260.76	61.657*	0.000*
F	79.491	21.111	103.235*		
P	0.000	0.000	0.000*	(F=34.421, P=0.000) [#]	

* F statistic and P value of main effect; [#] F statistic and P value of crossover effect.

Table 19 The expression of p-12E8^{Ser262} protein in the hippocampus of rats (WB, Integral absorbance value) ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Groups	Saline	2, 6-Diisopropylphenol	Sum	F	P
No intervention	194.88 $\pm$ 34.21	152.25 $\pm$ 32.69	173.56 $\pm$ 39.10	22.870	0.000
ECT	312.88 $\pm$ 49.80	208.88 $\pm$ 37.48	260.88 $\pm$ 68.54	22.270	0.000
Sum	253.88 $\pm$ 73.60	180.56 $\pm$ 44.83	217.22 $\pm$ 70.57	28.085*	0.000*
F	30.514	10.370	39.835*		
P	0.000	0.006	0.000*	(F=4.921, P=0.035) [#]	

* F statistic and P value of main effect; [#] F statistic and P value of crossover effect.

Table 20 The expression of GSK-3 β ^{IH8} protein in the hippocampus of rats (WB, Integral absorbance value) ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Groups	Saline	2, 6-Diisopropylphenol	Sum	F	P
No intervention	460.63 $\pm$ 65.83	235.88 $\pm$ 38.19	348.25 $\pm$ 127.17	69.767	0.000
ECT	940.25 $\pm$ 151.12	570.00 $\pm$ 104.75	755.13 $\pm$ 228.77	32.437	0.000
Sum	700.44 $\pm$ 272.07	402.94 $\pm$ 188.61	551.69 $\pm$ 275.45	71.517*	0.000*
F	67.735	71.839	133.770*		
P	0.000	0.000	0.000*	(F=4.277, P=0.048) [#]	

* F statistic and P value of main effect; [#] F statistic and P value of crossover effect.

ECT 和 2, 6- 二异丙基苯酚对海马 PP-2A 的表达均无明确影响(ECT: $F=1.890$, $P=0.180$) (2, 6- 二异丙基苯酚: $F=3.000$, $P=0.094$); 而且

ECT 和 2, 6- 二异丙基苯酚亦未见交互效应($F=0.060$, $P=0.808$)(图 3, 表 21).

Table 21 The expression of PP-2A protein in the hippocampus of rats (WB, Integral absorbance value) ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Groups	Saline	2, 6-Diisopropylphenol	Sum	F	P
No intervention	1000.88±172.95	1088.25±153.79	1044.56±164.41	1.140	0.304
ECT	905.75±146.64	1021.88±188.04	963.81±173.58	1.897	0.190
Sum	953.31±162.50	1055.06±169.45	1004.19±171.30	3.000*	0.094*
F	1.408	0.597	1.890*		
P	0.255	0.452	0.180*	$(F=0.060, P=0.808)^{\#}$	

* F statistic and P value of main effect; $\#$ F statistic and P value of crossover effect.

3 讨 论

3.1 Glu 与学习记忆障碍

Glu 在人脑中的含量为 $8.4 \mu\text{mol/g}$, 是最重要的兴奋性递质, 大约 40% 的突触以 Glu 为递质. Glu 对学习记忆的影响具有双向作用, 其适当激动 NMDA 受体是学习记忆所必需的^[20, 28], 但如果脑内 Glu 释放过多, 过度激动膜电位依赖式 GluR 导致 Ca^{2+} 大量内流, 激活对 Ca^{2+} 敏感的各种酶类, 产生氧自由基、线粒体损害, 激活磷酸肌醇环路, 破坏细胞的超微结构, 使神经元变性乃至死亡^[21], 造成学习记忆障碍.

ECT 后出现的学习记忆功能受损可能与 GluR 过度激动过度引起氧化应激, 导致海马 LTP 饱和状态, 造成突触可塑性障碍有关^[19, 24]. 本实验发现 ECT 后海马 Glu 浓度明显上升, 同时伴有学习记忆能力下降, 这一实验结果与以往的实验结果相同.

3.2 2, 6-二异丙基苯酚与 Glu

2, 6- 二异丙基苯酚是一种较理想的静脉全麻药, 其作用于中枢神经系统的机制与抑制 Glu 及 NMDA 受体有关. 2, 6- 二异丙基苯酚可减轻单纯 ECT 导致的抑郁大鼠学习记忆损害, 其机制可能与减弱神经系统的兴奋性毒性有关^[9, 15]. 其机制推测如下: a. 2, 6- 二异丙基苯酚可抑制神经元合成 Glu. b. 2, 6- 二异丙基苯酚抑制海马内突触体释放 Glu, 2, 6- 二异丙基苯酚通过保护 Na^+/H^+ 交换体的活性恢复氧化应激损伤的神经胶质细胞的 Glu 转运速率, 2, 6- 二异丙基苯酚可通过抑制钠通道减

少应激时细胞外 K^+ 浓度升高导致的膜电位去极化, 使 Glu 释放减少, 2, 6- 二异丙基苯酚能抑制 NOS 活性, 抑制 NO 生成和 Glu 释放. c. 2, 6- 二异丙基苯酚的苯环基团可作用于 NMDA 受体的苯环己哌啶结合位点, 非竞争性拮抗 NMDA 受体, 缩短兴奋性突触后电位持续时间, 降低细胞兴奋性并阻止过度损伤引起的去极化. 本实验发现 2, 6- 二异丙基苯酚可以降低 ECT 后海马组织中的 Glu 含量, 且同时可改善 ECT 后的学习记忆, 与以往实验结果一致.

有研究发现, 2, 6- 二异丙基苯酚对大鼠皮层和海马脑片 Glu 损伤无保护作用, 大剂量反而加重损伤^[29-30], 与本实验结果不符, 分析可能与该实验中所用离体脑片不能完全模拟活体内环境有关.

3.3 Tau 蛋白过磷酸化与学习记忆

实验结果表明, 学习记忆能力与 Tau 过度磷酸化有关, Tau 蛋白磷酸化程度愈高者学习记忆能力越差, 这一点表现为免疫组化所示海马中磷酸化 Tau 蛋白表达上调和免疫印迹所示的海马中磷酸化 Tau 蛋白含量增高的同时, 大鼠的逃避潜伏期延长和空间探索时间的缩短. 前者说明实验大鼠学习能力受损, 后者表明实验大鼠外显记忆能力亦下降.

外显记忆属于进入意识系统的长期记忆, 又名陈述性记忆, 其神经传导通路以边缘系统为主, 其短期储存定位在于颞叶内侧结构(medial temporal lobe, MTL), 包括海马、嗅内皮质、嗅旁皮质、海马旁回(其中外显记忆中的情景记忆完全依赖于海马). 边缘系统的海马在记忆中起通道的关键作用^[31], 不但与近期记忆关系密切, 且海马结构 CA1 区和齿状回在大鼠空间长时记忆形成中具有重要作

用^[32]. 本实验所进行的水迷宫测试即主要为情景记忆中的空间记忆, 人或动物的空间记忆被总结在海马位置内储存的认知地图(cognitive map)^[33], 海马位置细胞接收各种来源的空间信息后, 可对这些信息进行加工处理, 在海马内形成认知地图或加强联合皮层内细胞集群的突触联系以形成对空间位置的永久记忆. 本实验选择海马进行检测, 发现海马内 Glu 浓度的升高及相应 Tau 蛋白的过度磷酸化程度增强会导致大鼠空间记忆能力明显受损, 而 2, 6-二异丙基苯酚部分阻断 Glu 的兴奋性毒性并进而缓解 Tau 蛋白的过度磷酸化程度后, 大鼠空间记忆能力受损程度减轻. 这一实验结果也验证了海马组织在空间记忆乃至外显记忆中的关键作用.

Tau 蛋白是高度不对称的磷蛋白, 主要分布在大脑的额叶、颞叶、海马和内嗅区神经元以及外周神经的轴突内^[34]. Tau 蛋白一级结构最突出的特点是在蛋白质羧基端具有 3~4 个含 31 或 32 个氨基酸残基的重复区, 即主体结构呈 Pro-Gly-Gly-Gly 的“重复串联”, 这些重复区参与构成 Tau 蛋白的微管结合区, 其主要功能是促进轴突微管的装配和稳定, 保持微管间的距离^[3], 影响神经细胞轴突的物质运输功能. 正常 Tau 蛋白约每分子含两个磷酸分子, 其高度异常磷酸化位点有 21 个, 都是丝氨酸残基(Ser)和苏氨酸残基(Thr), 多以 Ser 或 Thr 后续脯氨酸(Pro)的连接形式存在, 主要分布于 Tau 蛋白重复区附近的两个侧区内. 正常情况下磷酸化的 Tau 蛋白分布在神经元突起, 而非磷酸化的 Tau 蛋白分布在胞体. Tau 蛋白磷酸化是调节神经元功能最主要的手段^[4, 35], Tau 蛋白过度磷酸化会造成其空间构型错误折叠^[6]和分子聚集^[7], 可降低轴突转运的效率, 导致神经信号传递的障碍及突触退化, 且 Tau 蛋白为 Capase-3 分解后的残片可诱导神经元凋亡^[8, 36], 而异常磷酸化后的 Tau 蛋白丧失对 DNA 的保护作用, 可引起 DNA 损伤甚至细胞死亡^[37-38], 最终导致学习记忆损害^[8, 39].

本实验与相关研究结果一致, 而且实验表明, 总 Tau 蛋白的表达在神经元的 ECT 应激前后没有明显变化, 在诸过度磷酸化位点中, Ser^{199/202}位点磷酸化程度与 ECT 应激关系最为紧密, 似乎在导致学习记忆障碍的 Tau 蛋白过度磷酸化机制中扮演主要角色. 这可能缘于 Ser²⁰²位点定位于微管结合区, 其磷酸化参与调节 Tau 蛋白与微管的结合活性^[11]. 此外, 本实验中观察到 ECT 后 Glu 在神经元中的浓度明显升高, 与武凤英等^[22]发现应激可激

活兴奋性神经传递系统诱导海马 Tau 蛋白过磷酸化的研究结果一致.

3.4 2, 6-二异丙基苯酚与 Tau 蛋白过度磷酸化

2, 6-二异丙基苯酚不但可以降低脑中 Glu 的含量, 且其可通过升高 Akt 活性^[40], 抑制神经元凋亡^[41]. Akt 是 PIK/AKT 信号转导通路的核心, 可通过下调 GSK-3 β 的活性而抑制 Tau 蛋白磷酸化程度^[42].

本实验发现, 2, 6-二异丙基苯酚可以降低 ECT 后海马中 Glu 浓度, 同时减轻海马中 Tau 蛋白过度磷酸化的程度(即减少海马中磷酸化 Tau 蛋白的表达, 也减少磷酸化 Tau 蛋白在海马中的浓度, 两者变化方向一致), 进而改善 ECT 后的学习记忆能力. 所以, 推测 2, 6-二异丙基苯酚可以从两个方面打断 ECT 应激导致 Tau 蛋白磷酸化程度增加的信号通路, 即: 2, 6-二异丙基苯酚既可降低脑中 Glu 浓度亦可升高 Akt 活性; 当然后者也可能是通过前者造成的继发效果.

3.5 2, 6-二异丙基苯酚逆转抑郁大鼠 ECT 后的 Tau 蛋白过度磷酸化和认知障碍的信号传导机制

Tau 蛋白过度磷酸化的内源性机制是由于脑中 Tau 蛋白自身代谢异常导致的 Tau 蛋白异常过度磷酸化. Tau 蛋白过度磷酸化的外源性机制是指蛋白激酶和蛋白磷酸酶^[43]的平衡失调引起的 Tau 蛋白过度磷酸化^[44]. GSK-3 β 是一种多功能的丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶, 是目前发现最强有力的 Tau 蛋白激酶^[9, 13-15], GSK-3 β ¹¹⁸ 是其最主要的活性形式^[45-46]. GSK-3 β 可催化 Tau 蛋白多个位点的磷酸化^[47], 其中包括 Thr¹⁸¹、Ser¹⁹⁹、Ser²⁰²、Thr²⁰⁵、Thr²¹²、Thr²¹⁷、Thr²³¹、Ser³⁹⁶ 和 Ser⁴⁰⁴^[10-12], GSK-3 β 活性上调可能是引起大鼠海马内 Tau 蛋白过度磷酸化的一个重要原因^[48-49]. 此外, 正常成年人脑表达有 6 种 Tau 的变体, 其由单一基因编码, 通过对外显子 2、3 和 10 的可变剪接而产生. 外显子 10 的编码与否决定了 Tau 蛋白是含有 3 个或 4 个微管结合重复片段(three or four microtubule binding repeats, 3R-Tau 或 4R-Tau)^[50]. 4R-Tau 比 3R-Tau 具有更强的刺激微管组装的能力, 但也更容易被磷酸化, 在正常人脑中, 3R-Tau 和 4R-Tau 的表达比例约为 1. GSK-3 β 磷酸化 9G8, 并影响它调节的 Tau 外显子 10 可变剪接^[51], 从而影响 Tau 蛋白的生理功能.

蛋白磷酸酶 2A(protein phosphatase 2A, PP-2A)是真核生物体内的主要丝 / 苏氨酸蛋白磷酸酶, 其作用涉及到细胞增殖、分化、生长、凋亡等过程中

的多条信号途径, 其全酶由结构亚单位 A、调节亚单位 B 和催化亚单位 C 组成, 其催化活性位于 C 亚单位, 主要受全酶组装和翻译后修饰的调节. PP-2A 是活性最强的 p-Tau 磷酸酯酶^[17], 其去磷酸化作用的 K_m 值为 $(8.0 \pm 2.8) \mu\text{mol/L}$, 占人脑总 Tau 蛋白磷酸酯酶活性的 71%, 可催化人脑 Tau 蛋白 Ser^{199/202}、Thr²⁰⁵、Thr²¹²、Ser²¹⁴、Ser²³⁵、Ser²⁶²、Ser^{396/404} 多个位点去磷酸化^[52], 使 p-Tau 恢复生物学功能^[16], 从而改善学习记忆能力.

GSK-3 β 和 PP-2A 是 Tau 蛋白磷酸化程度的主要调控者, 本实验发现 ECT 导致的 Tau 蛋白过度磷酸化程度以及相应的认知障碍与 PP-2A 在海马内的表达无明显关系, 而与 GSK-3 β 的表达密切相关. 即 ECT 通过海马内兴奋性神经递质 Glu 的浓度抑制包括 Akt 等多种蛋白激酶的活性^[53], 而 Akt 为 GSK-3 β 的上游调节分子^[42], 从而进一步使得 GSK-3 β 的活性升高, 最终使海马神经元 Tau 蛋白磷酸化程度增加, 影响降低轴突转运的效率, 神经信号传递的障碍及突触退化, 甚至造成神经元凋亡或死亡, 从而导致学习记忆功能障碍. 其中, 海马 Tau 蛋白过磷酸化之后会导致神经递质运输障碍, 可进一步造成 Glu 在受损神经元的积聚, 形成恶性循环, 加重神经元损伤程度. 在此信号转导途径中, GluR、Akt 和 GSK-3 β 均是关键节点, 而 PP-2A 则与本过程无明显关系. 正如本实验结果所示, 如果阻断其中某一环节(如使用 2, 6-二异丙基苯酚降低脑内 Glu 或升高 Akt 活性), 则 ECT 等强应激所致海马 Tau 蛋白过磷酸化程度会明显减缓, 同时学习记忆障碍会相应缓解.

致谢 感谢清华大学医学院左焕琮教授和刘破资教授在实验设计方面的点拨, 感谢天津市神经病学研究所神经肿瘤研究室康春生教授提供的实验指导.

参 考 文 献

- [1] Weingarten M D, Lockwood A H, Hwo S Y, *et al.* A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1975, **72**(5): 1858-1862
- [2] Cleveland D W, Hwo S Y, Kirschner M W. Purification of Tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol*, 1977, **116**(2): 207-225
- [3] 王建枝, 龚成新, Grundke-Iqbal I, 等. 阿尔茨海默病 tau 蛋白异常修饰与其功能的关系. *生物化学与生物物理进展*, 1999, **26**(2): 154-157
Wang J Z, Gong C X, Grundke-Iqbal I, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 1999, **26**(2): 154-157
- [4] De Calignon A, Fox L M, Pitstick R, *et al.* Caspase activation precedes and leads to tangles. *Nature* 2010, **464**(16): 1201-1204
- [5] 杨江勇, 顾建兰, 施建华, 等. O-GlcNAc 糖基转移酶(OGT)基因表达的抑制对 tau 蛋白磷酸化作用的影响. *生物化学与生物物理进展*, 2009, **36**(3): 346-352
Yang J Y, Gu J L, Shi J H, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2009, **36**(3): 346-352
- [6] Naqvi S H, 王维山, 苗君叶, 等. 甲醛诱导 Tau 蛋白形成“孔道样”聚集结构. *生物化学与生物物理进展*, 2010, **37**(11): 1195-1203
Naqvi S H, Wang W S, Miao J Y, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2010, **37**(11): 1195-1203
- [7] 李芳序, 卢 静, 许亚杰, 等. 老年性痴呆发病过程中内源性甲醛慢性损伤机制. *生物化学与生物物理进展*, 2008, **35**(4): 393-400
Li F X, Lu J, Xu Y J, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2008, **35**(4): 393-400
- [8] Onishi T, Iwashita H, Uno Y, *et al.* A novel glycogen synthase kinase-3 inhibitor 2-methyl-5-(3-{4-[(S)-methylsulfinyl]phenyl}-1-benzofuran-5-yl)-1, 3, 4-oxadiazole (MMBO) decreases Tau phosphorylation and ameliorates cognitive deficits in a transgenic model of alzheimer's disease. *J Neurochem*, 2011, DOI: 10.1111/j.1471-4159.2011.07532.x
- [9] Sun Q, Gamblin T C. Pseudohyperphosphorylation causing AD-like changes in tau has significant effects on its polymerization. *Biochemistry*, 2009, **48**(25): 6002-6011
- [10] Blazquez-Llorca L, Garcia-Marin V, Merino-Serrais P, *et al.* Abnormal Tau phosphorylation in the thorny excrescences of CA3 hippocampal neurons in patients with Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 2011, **26**(4): 683-698
- [11] Bibow S, Ozenne V, Biernat J, *et al.* Structural impact of proline-directed pseudophosphorylation at AT8, AT100, and PHF1 epitopes on 441-residue Tau. *J Am Chem Soc*, 2011, **133**(40):15842-15845
- [12] 刘 飞, 施建华, 丁绍红, 等. 糖原合成酶激酶 3 β 对微管相关蛋白 tau 的磷酸化作用. *生物化学与生物物理进展*, 2007, **34**(9): 945-951
Liu F, Shi J H, Ding S H, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2007, **34**(9): 945-951
- [13] Wang Q, Zhang J Y, Liu S J, *et al.* Overactivated mitogen-activated protein kinase by anisomycin induces tau hyperphosphorylation. *Acta Psiologica Sinica*, 2008, **60**(4): 485-491
- [14] Fu Z Q, Yang Y, Song J, *et al.* LiCl attenuates thapsigargin-induced tau hyperphosphorylation by inhibiting GSK-3 β *in vivo* and *in vitro*. *J Alzheimers Dis*, 2010, **21**(4): 1107-1117
- [15] De Vos A, Anandhakumar J, Van den Brande J, *et al.* Yeast as a model system to study tau biology. *Int J Alzheimers Dis*, 2011, DOI: 10.4061/2011/428970
- [16] Liang Z, Liu F, Iqbal K, *et al.* Decrease of protein phosphatase 2A and its association with accumulation and hyperphosphorylation of tau in Down syndrome. *J Alzheimers Dis*, 2008, **13**(3): 295-320
- [17] Zhang Y, Liang J, Sun L, *et al.* Inhibition of PP-2A and the

- consequent activation of JNK/c-Jun are involved in tributyltin-induced apoptosis in human amnionic cells. *Environ Toxicol*, 2011, doi: 10.1002/tox.20730
- [18] Luo J, Min S, Wei K, *et al.* Propofol protects against impairment of learning-memory and imbalance of hippocampal Glu/GABA induced by electroconvulsive shock in depressed rats. *J Anesth*, 2011, **25**(5): 657-665
- [19] Andrade C, Singh N M, Thyagarajan S, *et al.* Possible glutamatergic and lipid signalling mechanisms in ECT-induced retrograde amnesia: experimental evidence for involvement of COX-2, and review of literature. *J Psychiatr Res*, 2008, **42**(10): 837-850
- [20] Kloda A, Martinac B, Adams D J. Polymodal regulation of NMDA receptor channels. *Channels (Austin)*, 2007, **1**(5): 334-343
- [21] Shutter L, Tong K A, Holshouser B A. Proton MRS in acute traumatic brain injury: role for glutamate/glutamine and choline for outcome prediction. *J Neurotrauma*, 2004, **21**(12): 1693-1705
- [22] 武凤英, 冯 琼, 程 敏, 等. 兴奋性氨基酸受体的激活介导冷水应激诱导的 tau 蛋白磷酸化. *生物化学与生物物理进展*, 2010, **37**(5): 510-516
- Wu F Y, Feng Q, Cheng M, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2010, **37**(5): 510-516
- [23] Petroni D, Tsai J, Mondal D, *et al.* Attenuation of low dose methylmercury and glutamate induced-cytotoxicity and tau phosphorylation by an N-methyl-D-aspartate antagonist in human neuroblastoma (SHSY5Y) cells. *Environ Toxicol*, 2011, DOI: 10.1002/tox.20765
- [24] Dong J, Min S, Wei K, *et al.* Effects of electroconvulsive therapy and propofol on spatial memory and glutamatergic system in hippocampus of depressed rats. *J ECT*, 2010, **26**(2): 126-130
- [25] Wang D, Noda Y, Tsunekawa H, *et al.* Bshavioural and neurochemical feaures of olfactory bulbertomized rats resembling depression with comorbid anixiety. *Behav Brain Res*, 2007, **178**(2): 262-273
- [26] Tasset I, Medina F J, Pena J, *et al.* Olfactory bulbertomy induced oxidative and cell damage in rat: protective effect of melatoni. *Physiol Res*, 2010, **59**(2): 105-112
- [27] Altar C A, Laeng P, Jurata L W, *et al.* Electroconvulsive seizures regulate gene expression of distinct neurotrophic signaling pathways. *J Neuresci*, 2004, **24**(11): 2667-2677
- [28] Bardo S, Cavazzini M G, Emptage N. The role of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} store in the plasticity of central neurons. *Trends Pharmacol Sci*, 2006, **27**(2): 78-84
- [29] 于布为, 薛庆生, 夏 梦, 等. 丙泊酚对大鼠脑片不同性质损伤的影响. *中华医学杂志*, 2003, **83**(13): 1176-1179
- Yu B W, Xue Q S, Xia M, *et al.* *Natl Med J China*, 2003, **83**(13): 1176-1179
- [30] Zhu H, Cottrell J E, Kass I S. The effects of thiopental and propofol on NMDA and AMPA mediated glutamate excltotoxicity. *Anesthesiology*, 1997, **87**: 944-951
- [31] 倪 兵, 钱晨灿, 吴睿洁, 等. 海马参与工作记忆目标匹配增强及其时间过程——基于颅内脑电的研究. *生物化学与生物物理进展*, 2011, **38**(11): 1027-1035
- Ni B, Qian C C, Wu R J, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2011, **38**(11): 1027-1035
- [32] Choi B R, Kwon K J, Park S H, *et al.* Alternations of septal-hippocampal system in the adult wistar rat with spatial memory impairments induced by chronic cerebral hypoperfusion. *Exp Neurobiol*, 2011, **20**(2): 92-99
- [33] Preissmann D, Bertholet L, Sierro G, *et al.* Accurate performance of a rat model of schizophrenia in the water maze depends on visual cue availability and stability: a distortion in cognitive mapping abilities?. *Behav Brain Res*, 2011, **223**(1): 145-153
- [34] 盛之玲, 曲梅花, 何海进, 等. HeLa、HEK293、SH-SY5Y 细胞中的 Tau 蛋白. *生物化学与生物物理进展*, 2008, **35**(12): 1364-1370
- Sheng Z L, Qu M H, He H J, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2008, **35**(12): 1364-1370
- [35] 曲忠森, 李 亮, 钟士江, 等. 糖尿病大鼠脑细胞周期依赖性蛋白激酶 A 和蛋白激酶 5 参与调节 Tau 蛋白磷酸化. *生物化学与生物物理进展*, 2007, **34**(12): 1308-1313
- Qu Z S, Li L, Zhong S J, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2007, **34**(12): 1308-1313
- [36] 段 萍, 李夏春, 邓艳秋, 等. Capase-3 对磷酸化 tau 蛋白截断作用的研究. *生物化学与生物物理进展*, 2005, **32**(1): 81-85
- Duan P, Li X C, Deng Y Q, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2005, **32**(1): 81-85
- [37] Carroll J C, Iba M, Bangasser D A, *et al.* Chronic stress exacerbates tau pathology, neurodegeneration, and cognitive performance through a corticotropin-releasing factor receptor-dependent mechanism in a transgenic mouse model of tauopathy. *J Neurosci*, 2011, **31**(40): 14436-14449
- [38] 石 俊, 李 旭, 卢 芬, 等. 饥饿对小鼠脑中 tau 蛋白磷酸化和 O-GlcNAc 糖基化的影响. *生物化学与生物物理进展*, 2006, **33**(7): 647-652
- Shi J, Li X, Lu F, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2006, **33**(7): 647-652
- [39] 卢 静, 苗君叶, 潘 荣, 等. 甲醛诱导的磷酸化减弱 Tau 蛋白与 DNA 相互作用. *生物化学与生物物理进展*, 2011, **38**(12): 1113-1120
- Lu J, Miao J Y, Pan R, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2011, **38**(12): 1113-1120
- [40] Wang B, Shravah J, Luo H, *et al.* Propofol protects against hydrogen peroxide-induced injury in cardiac H9c2 cells via Akt activation and Bcl-2 up-regulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, **389**(1): 105-111
- [41] Xi H J, Zhang T H, Tao T, *et al.* Propofol improved neurobehavioral outcome of cerebral ischemia-reperfusion rats by regulating Bcl-2 and Bax expression. *Brain Res*, 2011, **1410**: 24-32
- [42] Chin P C, Majdzadeh N, D'Mello S R. Inhibition of GSK3beta is a common event in neuroprotection by different survival factors. *Brain Res Mol Brain Res*, 2005, **137**(1-2): 193-201
- [43] Bulbarelli A, Lonati E, Cazzaniga E, *et al.* Pin1 affects Tau phosphorylation in response to abeta oligomers. *Mol Cell Neurosci*, 2009, **42**(1): 75-80

- [44] 殷冬梅, 施建华, 顾建兰, 等. 微管相关蛋白 tau 在动物死后被快速去磷酸化. 生物化学与生物物理进展, 2005, **32**(12): 1150–1155
Yin D M, Shi J H, Gu J L, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2005, **32**(12): 1150–1155
- [45] Anthony P, Popkie, Leigh C, *et al.* Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) signaling *via* glycogen synthase kinase-3 (Gsk-3) regulates DNA methylation of imprinted loci. J Biol Chem, 2010, **285**(53): 41337–41347
- [46] Adam R Cole, Calum Sutherland. Wnt Signaling: Methods in Molecular Biology. New York: Humana Press, 2008: 45–65
- [47] 杨 雁, 胡蜀红, 张建华, 等. 肥胖及 2 型糖尿病大鼠 Alzheimer 病样 Tau 蛋白过度磷酸化及机制探讨. 生物化学与生物物理进展, 2006, **33**(5): 458–464
Yang Y, Hu S H, Zhang J H, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2006, **33**(5): 458–464
- [48] 胡蜀红, 杨 雁, 张建华, 等. 罗格列酮改善胰岛素抵抗大鼠海马 Alzheimer 病样 tau 蛋白磷酸化水平. 生物化学与生物物理进展, 2007, **34**(5): 533–537
Hu S H, Yang Y, Zhang J H, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2007, **34**(5): 533–537
- [49] 曲忠森, 赵永波, 刘文文, 等. 糖尿病大鼠脑 GSK-3 与 PP-2A 失调诱导 tau 蛋白过度磷酸化. 生物化学与生物物理进展, 2006, **33**(8): 789–794
Yang Y, Hu S H, Zhang J H, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2006, **33**(8): 789–794
- [50] Ray P, Kar A, Fushimi K, *et al.* PSF Suppresses Tau Exon 10 Inclusion by Interacting with a Stem-Loop Structure Downstream of Exon 10. J Mol Neurosci, 2008, **45**(3): 453–466
- [51] 丁绍红, 尹晓敏, 施建华, 等. 糖原合酶激酶-3 β 调节 9G8 介导的 tau 外显子 10 的可变剪接. 生物化学与生物物理进展, 2010, **37**(2): 161–166
Ding S H, Yin X M, Shi J H, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2010, **37**(2): 161–166
- [52] 刘 蓉, 王小川, 黄 尧, 等. 急性缺氧和急性低血糖对脑片 tau 蛋白磷酸化的影响. 生物化学与生物物理进展, 2004, **31**(5): 402–408
Liu R, Wang X C, Huang Y, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2004, **31**(5): 402–408
- [53] Lehtihel M, Honkanen R E, Sjöholm A. Glutamate inhibits protein phosphatases and promotes insulin exocytosis in pancreatic beta-cells. Biochem Biophys Res Commun, 2005, **328**(2): 601–607

2, 6-Diisopropylphenol Protects Against The Impairment of Learning-memory and Reduces The Hyperphosphorylation of Protein Tau Induced by Electroconvulsive Shock in The Depression Model Rats Whose Olfactory Bulbs Were Removed*

LIU Chao¹⁾, MIN Su^{1)**}, WEI Ke¹⁾, LIU Dong²⁾, DONG Jun¹⁾, LUO Jie¹⁾, LIU Xiao-Bin¹⁾*

¹⁾ Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

²⁾ Department of Neurosurgery, The Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China)

Abstract Protein Tau is a very unequal phosphoric microtubule associated protein, which affect the transport of substances in the axons of the neurons, whose phosphorylation is one of the key methods to regulate neuronal function. The hyperphosphorylation of protein Tau can damage the learning and memory of rats. The impairment of learning-memory induced by electroconvulsive shock in depressed rats is relevant to the function failure of glutamic acid signal system. The phosphorylation of protein Tau can be up-regulated by the individual stress level through the excitatory neurotransmission system. The mechanisms of 2, 6-diisopropylphenol effect on the central nerve system relate to inhibiting the release of glutamic acid and the activity of NMDAR. And the 2, 6-diisopropylphenol can protects against the impairment of learning-memory induced by electroconvulsive shock in depressed rats though inhibiting the excitotoxicity of glutamate. The rise of glutamic acid which induced by electroconvulsive shock in depressed rats can lead to the impairment of learning-memory through up-regulating the hyperphosphorylation of protein Tau? The 2, 6-diisopropylphenol can protect against this process? This study explore the reversion of the 2, 6-diisopropylphenol against the impairment of learning-memory and the

hyperphosphorylation of protein Tau induced by electroconvulsive shock in depressed rats, in order to provide experimental evidence for neuropsychological mechanisms on improving learning and memory and the clinical intervention treatment. According to the design of factorial analysis, two intervention factors were set up: the electroconvulsive shock (two levels: no disposition; a course of electroconvulsive shock) and the 2, 6-diisopropylphenol (two levels: 5 ml Saline was injected peritoneally; 5 ml 2, 6-diisopropylphenol was injected peritoneally by dosage of 100 mg/kg). Thirty-two adult depression model rats whose olfactory bulbs were removed were randomly divided into four experimental groups ($n=8$, in each group): group I (5 ml 2, 6-diisopropylphenol was injected peritoneally in the Sprague-Dawley rats by dosage of 100 mg/kg); group II (5 ml 2, 6-diisopropylphenol was injected peritoneally in the Sprague-Dawley rats by dosage of 100 mg/kg and giving a course of electroconvulsive shock); group III (5ml Saline was injected peritoneally in the Sprague-Dawley rats); group IV (5 ml saline was injected peritoneally in the Sprague-Dawley rats and giving a course of electroconvulsive shock). The Morris water maze test started within 1 day after the course of electroconvulsive shock finished in order to evaluate learning-memory. The hippocampus was removed from rats within 1 day after the Morris water maze test finished. The content of glutamate in the hippocampus of rats was detected by high performance liquid chromatography. The content of Protein Tau which includes Tau-5 (Total protein Tau), p-PHF1^{Ser396/404}, p-AT8^{Ser199/202}, p-12E8^{Ser262}, GSK-3 β ^{I^H} and PP-2A in the hippocampus of rats was detected with Western blotting. The electroconvulsive shock and the 2, 6-diisopropylphenol can induce the impairment of learning-memory in depressed rats, extending the evasive latency time and shortening the space exploration time. And both influences present subtract effect. The electroconvulsive shock can significantly up-regulate the content of glutamate in the hippocampus of depressed rats which was reduced by 2, 6-diisopropylphenol. And both influences present subtract effect. The electroconvulsive shock and the 2, 6-diisopropylphenol does not affect the total protein Tau and protein PP-2A in the hippocampus of rats. The electroconvulsive shock can up-regulate the hyperphosphorylation of protein Tau and the expression of GSK-3 β ^{I^H} in the hippocampus of depressed rats, which is reduced by 2, 6-diisopropylphenol. And both influences present subtract effect. Our results indicate that the electroconvulsive shock up-regulates the content of glutamate in the hippocampus of depressed rats, which up-regulates the hyperphosphorylation of protein Tau through up-regulating the expression of GSK-3 β ^{I^H}, and further induce the impairment of learning-memory in depressed rats. Whereas, the 2, 6-diisopropylphenol protects against the impairment of learning-memory and reduce the hyperphosphorylation of protein Tau induced by electroconvulsive shock in depressed rats through reducing the expression of GSK-3 β ^{I^H} and the content of glutamate in the hippocampus.

Key words 2, 6-diisopropylphenol, electroconvulsive therapy, learning and memory ability, protein Tau, hyperphosphorylation, glycogen synthase kinase-3 β

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00483

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30972831).

**Corresponding author.

Tel/Fax: 86-23-89011068, E-mail: minsu89011068@yahoo.com.cn

Received: October 26, 2011 Accepted: March 14, 2012