

罗格列酮调节 IDE 和 GSK-3 β 的活性改善 阿尔茨海默病动物认知能力

杨文青¹, 马 晶¹, 宋晓征², 余华荣¹

(1. 重庆医科大学基础医学院生理教研室、神经科学研究中心, 重庆 400016; 2. 三六三医院神经内科, 成都 610041)

【摘要】目的:研究作为胰岛素增敏剂的过氧化物酶体增殖因子活化受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptors γ , PPAR γ) 激动剂-罗格列酮对阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 动物模型的认知水平、 β 淀粉样蛋白 (amyloid β -peptide, A β) 和 Tau 的影响, 并探讨其改善 AD 模型认知能力的可能机制。**方法:**通过侧脑室注射链脲佐菌素建立 AD 动物模型, 并用罗格列酮处理动物, 第 1 次手术后 21 d 用 Morris 水迷宫检测动物的学习和记忆水平; 采用 Western blot 检测胰岛素降解酶 (insulin-degrading enzyme, IDE)、糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)、磷酸化糖原合成酶激酶-3 β (pGSK-3 β)、Tau、磷酸化 Tau (phosphoTau, pTau) 的表达; 通过免疫组化检测 A β 40 和 A β 42 在大脑的沉积。**结果:**Morris 水迷宫结果显示罗格列酮可以明显改善 AD 大鼠的认知能力 ($P < 0.001$); Western blot 结果显示罗格列酮能增加 IDE 的表达 ($P = 0.028$)、降低 GSK-3 β 的活性 ($P = 0.012$)、减少 Tau 的磷酸化水平 ($P = 0.001$); 免疫组化结果显示罗格列酮处理的大鼠, 其大脑皮质 A β 40 和 A β 42 的沉积量均较模型组减少。**结论:**罗格列酮可以明显改善 AD 动物的认知能力、A β 的沉积和 Tau 的磷酸化, 机制可能与其调节胰岛素信号通路相关的 IDE 和 GSK-3 β 的表达有关。

【关键词】阿尔茨海默病; 罗格列酮; β 淀粉样蛋白; Tau; 胰岛素降解酶; 糖原合成酶激酶-3 β

【中国图书分类法分类号】R741.05

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-07-09

作者介绍: 杨文青, Email: ywqljtt@126.com,

研究方向: 神经病学。

通信作者: 余华荣, Email: 1370748729@qq.com。

参 考 文 献

- [1] 陈艳杏, 孙圣刚. 阿尔茨海默病中的钙紊乱机制研究进展[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2009, 36(5): 441-444.
- [2] Chen Y X, Sun S G. The progress of calcium dysregulation in Alzheimer's disease[J]. Journal of International Neurology and Neurosurgery, 2009, 36(5): 441-444.
- [3] Loskutova N, Honea R A, Vidoni E D, et al. Bone density and brain atrophy in early Alzheimer's disease[J]. J Alzheimers Dis, 2009, 18(4): 777-785.
- [4] Swerdlow R H, Burns J M, Khan S M, et al. Brain aging, Alzheimer's disease, and mitochondria[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2011, 1812(12): 1630-1639.
- [5] Hosokawa M, Kasai R, Higuchi K, et al. Grading score system: a method for evaluation of the degree of senescence in senescence accelerated mouse (SAM)[J]. Mech Ageing Dev, 1984, 26(1): 91-102.
- [6] Wang T J, Pencina M J, Booth S L, et al. Vitamin D deficiency and

- risk of cardiovascular disease[J]. Circulation, 2008, 117(4): 503-511.
- [6] Chen C C, Wang M F, Liu M H, et al. Effects of age on plasma levels of calcium-regulating hormones and bone status in male SAMP8 mice[J]. Chin J Physiol, 2004, 47(1): 7-14.
- [7] DHooge R, De Deyn P P. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory[J]. Brain Res Rev, 2001, 36(1): 60-90.
- [8] 胡镜清, 温泽淮, 赖世隆. Morris 水迷宫检测的记忆属性与方法学初探[J]. 广州中医药大学学报, 2000, 17(2): 117-119.
- [9] Hu J Q, Wen Z H, Lai S L. A preliminary study on the memory attribution and methodology of morris water maze test[J]. Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, 2000, 17(2): 117-119.
- [9] 陈长生, 徐勇勇, 曹秀堂. 医学研究中重复观测数据的统计分析方法[J]. 中国卫生统计, 1996, 13(6): 55-58.
- Chen C S, Xu Y Y, Cao X T. The statistical analysis of the Repeated observational data in medical research[J]. Chinese Journal of Health Statistics, 1996, 13(6): 55-58.

(责任编辑: 关蕴良)

Rosiglitazone rescues memory impairment in Alzheimer's rats: mechanisms involving regulation of insulin-degrading enzyme and glycogen synthase kinase-3 β

YANG Wenqing¹, MA Jing¹, SONG Xiaozheng², YU Huarong¹

(1. Teaching and Research Section of Physiology, Research Center of Neuroscience, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University; 2. Department of Neurology, 363 Hospital)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) agonist-rosiglitazone (RTZ) on the cognition, amyloid β -peptide (A β) and Tau in the Alzheimer's disease (AD) rats and to explore its potential mechanisms of attenuating learning and memory deficits. **Methods:** Dementia model was established by treating rats with intracerebroventricular streptozotocin injection. RTZ was administered to rats in dementia model. On the 21st d from the 1st STZ injection, spatial learning and memory of rats were tested in Morris water maze. Expressions of insulin-degrading enzyme (IDE), glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β), phospho-GSK-3 β (pGSK-3 β), Tau and phospho-Tau (pTau) were measured by Western blot. A β 40 and A β 42 levels in the brain of AD rats were tested by immunohistochemistry. **Results:** AD rats administrating RTZ exhibited better spatial learning and memory abilities ($P < 0.001$) and had lower A β levels than untreated AD rats. Western blot demonstrated that RTZ decreased IDE expression ($P = 0.028$), GSK-3 β activity ($P = 0.012$) and pTau level ($P = 0.001$). Immunohistochemical results demonstrated that RTZ reduced A β 40 and A β 42 levels in the cerebral cortex. **Conclusions:** RTZ-mediated cognitive improvement of AD rats does correlate with the expression of IDE and GSK-3 β .

[Key words] Alzheimer's disease; rosiglitazone; amyloid β -peptide; Tau; insulin degrading enzyme; glycogen synthase kinase-3 β

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是老年人最常见的一种神经退行性疾病, 以进行性认知行为全面减退为临床特征。最近研究发现在 AD 患者早期阶段就出现了大脑葡萄糖代谢和能量代谢降低^[1], 流行病学调查也发现 2 型糖尿病和 AD 有着密切联系^[2], 因此, 有科学家提出 AD 是“3 型糖尿病”, 是一种中枢神经系统的内分泌疾病, 其中最主要的异常是胰岛素通路信号转导障碍^[3]。大脑胰岛素受体主要分布在嗅球、大脑皮层、海马、脑扁桃体和下丘脑; 其主要功能包括调节机体的能量平衡、突触的可塑性、认知功能以及与年龄相关的神经退行性变^[4], 这与 AD 的认知和记忆功能障碍的临床表现相关。

链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 是一种甲基亚硝基脲产物, 具有抗菌、抗肿瘤的性能和致糖尿病的副作用。在外周 STZ 可以选择性的破坏胰腺 β 细胞, 引起糖尿病。脑室注射 STZ 可以破坏中枢胰岛素受体的磷酸化, 引起胰岛素信号通路障碍。有大量研究表明^[5], 侧脑室 (intracerebroventricular, ICV) 注射小剂量 STZ 能导致脑局部的糖利用和能量代谢障碍, 可引起大鼠学习记忆障碍和胆碱能神经元丢失, 而胰岛的结构和胰岛素的基因表达不受影响。因此, ICV 注射 STZ 的动物模型可以用于研究大脑糖代谢异常引起 AD 的发病机制。

罗格列酮属于噻唑烷二酮类药物, 也是过氧化物酶体增殖因子活化受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptors γ , PPAR γ) 的激动剂, 现已被临床广泛应用于治疗 2 型糖尿病, 也是公认的胰岛素增敏剂。本研究拟采用罗格列酮处理 ICV-STZ 诱导的 AD 大鼠模型, 观察其能否改善动物的认知水平, 并检测与胰岛素信号通路相关分子的变化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 清洁级 SD 大鼠 21 只, 体质量 320~380 g, 购自重庆医科大学实验动物中心, 采用 Excel 表自动产生随机数字将动物分成 3 组, 即对照 (CON) 组, 模型 (STZ) 组和罗格列酮 (RTZ) 组。饲养于重庆医科大学实验动物中心, 动物自由进食和饮水。

1.1.2 试剂 罗格列酮 (重庆太极制药有限公司); STZ (Sigma 公司, 德国); pGSK-3 β 抗体 (碧云天生物有限公司); 糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β) 抗体 (Bioworld, 美国); β 淀粉样蛋白 40 (amyloid β -peptide 40, A β 40)、A β 42、Tau 抗体 (北京博奥森生物有限公司); 磷酸化 Tau (phosphoTau, pTau) 抗体 (Bioworld, 美国); 胰岛素降解酶 (insulin-degrading enzyme, IDE) 抗体 (武汉三鹰生物公司); 二抗均购自北京中杉金桥生物公司; 免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物公司。

1.2 方法

1.2.1 ICV 注射 STZ 动物用 10%水合氯醛(4 mg/kg)麻醉后固定在颅脑立体定位仪上(成都泰盛科技有限公司),局部常规消毒,头顶部沿矢状缝切开皮肤,分离骨膜,根据包新民的《大鼠脑立体定向图谱》定位,在前囟后 0.8 mm、矢状缝旁开 1.5 mm 处用锥颅器钻开颅骨,暴露硬脑膜,25 μ l 微量进样器自定位点进针,深度 3.5 mm 缓慢注入约 20 μ l 液体(注射时间为 5~10 min,STZ 组和 RTZ 组注射 STZ,3 mg/kg,用生理盐水溶解为浓度 25%的液体,CON 组则用等量生理盐水代替 STZ),注入后留针 5 min,以保证溶液充分弥散,再缓慢退出。术后第 3 天再重复注射 1 次。

1.2.2 动物术后的处理 术后给予葡萄糖水喂养,第 1 次手术后各组大鼠即给予不同的处理,RTZ 组给予罗格列酮 5 mg/kg(生理盐水溶解)灌胃,剂量约 1 ml;CON 组和 STZ 组则给予等剂量的生理盐水灌胃,共 3 周。

1.2.3 行为学检测 Morris 水迷宫为 1 个不锈钢的圆柱形水池,直径 120 cm,高 50 cm,水池壁标明 4 个入水点,盛水后水深约 30 cm,水温控制在 22 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C,将直径 11 cm,高 29 cm 的平台放置于水池中间,平台在水面下 1 cm。测试程序包括:(1)定位航行实验。将大鼠面向池壁放入水中,记录其在 120 s 内寻找到平台的时间,即为逃避潜伏期。如大鼠不能在 120 s 内找到平台,则由实验者用手牵引其到平台上停留 30 s,再放回笼中,间隔 30 min 再进行下一次实验。此项实验反映动物的学习能力。(2)空间探索实验。撤走平台,将大鼠从任意一个入水点放入池中,记录其在 120 s 内找到原平台所在的位置所需要时间,测试动物的记忆保持能力。

1.2.4 动物取材 每组各取 3 只动物,用 10%水合氯醛麻醉后,剪开胸腔腹腔,暴露心脏和肝脏,剪开右心耳,从左心室用生理盐水灌注至肝脏无血色,再用 4%多聚甲醛灌注约 120 ml,然后迅速取出大脑放入 4%多聚甲醛固定过夜约 24 h,行免疫组化切片染色。其余动物均采用断颈取脑,然后将脑组织放入液氮中备用。

1.2.5 免疫组织化学染色 先将脑组织进行石蜡包埋,行冠状面切片,并贴片烘烤。再将片架和玻片一同放入 60 $^{\circ}$ C二甲苯 I 和二甲苯 II 中各 20 min,后依次放入不同浓度酒精各 3 min,接着用枸橼酸缓冲液充分暴露抗原,然后使标本浸于 3% H_2O_2 去离子水及浸于封闭血清 20 min 后再滴一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜。第 2 天,滴二抗 37 $^{\circ}$ C 20 min,滴三抗 37 $^{\circ}$ C 20 min,DBA 显色,苏木精染色。酒精脱水,3 组二甲苯透明各 5 min,封片,显微镜下观察并拍照。

1.2.6 Western blot 半定量分析 首先碾碎组织,再加入裂解液,并在裂解液中加入 PMSF,裂解约 30 min 后移入 EP 管中,4 $^{\circ}$ C、11 000 g 离心 5 min,取少量上清液做 BCA 蛋白定量分析,其余上清液按 4:1 加入 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液,100 $^{\circ}$ C水中煮沸 5 min,然后放入-80 $^{\circ}$ C冰箱备用。根据 BCA 蛋白定量分析结果,每组取适量样本行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,再将蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜(Millipore,美国)上,5%脱脂奶粉封闭,一抗(IDE 1:125、Tau 1:25、pTau 1:500、GSK-3 β

1:500、pGSK-3 β 1:250)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 洗膜,二抗室温孵育 1 h,TBST 洗膜。通过 Bio-rad ChemiDocXRS 化学发光成像系统,进行曝光分析显影。

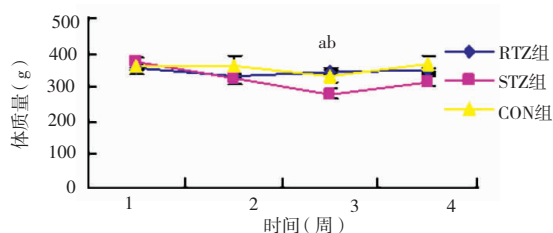
1.3 统计学分析

用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析。所有数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。对各组数据进行正态检验以及方差齐性检验,多组数据参数间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD- t 法检验分析(方差齐性)或 Tamhane 法检验分析(方差不齐)。检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧)。

2 结果

2.1 大鼠体质量

ICV 注射 STZ 后引起各组大鼠体质量不同程度的下降,第 3 周时 3 个组体质量相比不完全相同($F=28.953, P<0.001$),其中以模型组下降最为明显($P=0.003$)。见图 1。



数据采用均值 $\pm$ 平均差 ($n=6$); a: RTZ 组与 STZ 组相比, $P<0.05$; b: STZ 组与 CON 组相比, $P<0.05$

图 1 各组大鼠不同时期的体质量

Fig.1 Body weights of rats in each group at different terms

2.2 死亡率

大鼠经过 ICV 注射 STZ 及每天灌胃处理,造模期间共死亡 3 只,死亡率约 15%。故每组剩余动物数为 6 只。

2.3 Morris 水迷宫结果

2.3.1 定位航行实验 在 5 d 的定位航行实验中,各组动物的逃避潜伏期均逐渐缩短,而 STZ 组下降趋势不如 CON 组和 RTZ 组明显,并且 STZ 组大鼠找到平台后又立即跳入水中,说明 STZ 组大鼠的学习能力降低且游泳是盲目的。第 2 天开始 3 组的逃避潜伏期相比即不完全相同($F=20.128, P<0.001$),其中 STZ 组的逃避潜伏期与 CON 组相比差异有统计学意义($P<0.001, n=6$);第 3 天 RTZ 组与 STZ 组相比差异有统计学意义($P<0.001, n=6$)。见图 2。

2.3.2 空间探索实验 撤走平台后,CON 组和 RTZ 组的大鼠主要在原平台所在的象限活动,并且是有意地寻找原平台所在位置;而 STZ 组的大鼠则是盲目地沿着池壁游动,找到原平台所在的位置较 CON 组明显延长,3 组的空间探索时间相比不完全相同($F=15.325, P<0.001$),其中 STZ 组与 CON 组相比差异有统计学意义($P<0.001, n=6$);而 RTZ 组与 STZ 组相比则明显缩短,差异有统计学意义($P=0.002, n=6$)。图 3。

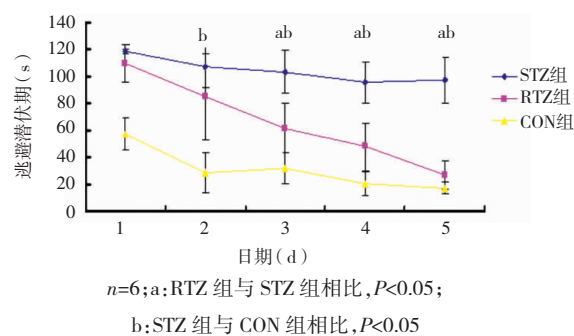


图2 各组大鼠逃避潜伏时间的比较

Fig.2 Comparison of escape latency time in each group in Morris water maze test

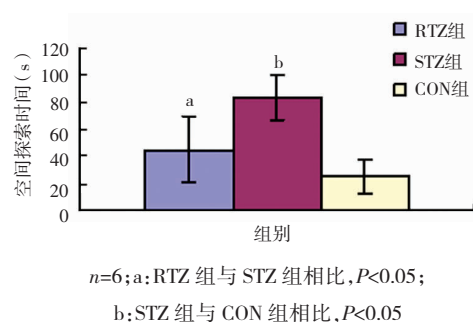
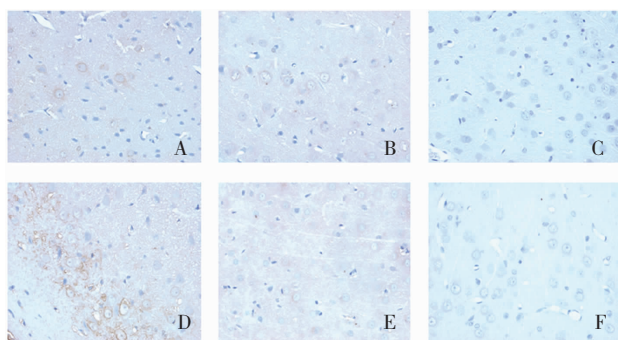


图3 各组大鼠空间探索时间的比较

Fig.3 Comparison of spatial probe time in each group in Morris water maze test

2.4 免疫组化检测罗格列酮对 AD 动物模型大脑的 A β 40 和 A β 42 的影响

A β 是 AD 的典型病理特征,其异常沉积可以引起局部炎症反应,甚至神经元的死亡。而 A β 40 和 A β 42 又是最主要的 2 种亚型,因此,采用免疫组化方法检测 A β 40 和 A β 42 在海马和皮层的沉积情况。从图 4 可知:STZ 组大鼠无论 A β 40 还是 A β 42 较 CON 组均明显增加(主要在皮质区,海马区不明显),而 RTZ 组的 A β 40 和 A β 42 与 STZ 组相比则明显减少。CON 组则几乎未见 A β 沉积。

A、B、C 为 A β 42 在 STZ 组、RTZ 组、CON 组的沉积;D、E、F 为 A β 40 在 STZ 组、RTZ 组、CON 组的沉积(DAB, 40 $\times$)图4 罗格列酮减少 A β 40 和 A β 42 在皮质区的沉积Fig.4 Reduce of A β 40 and A β 42 levels in the cerebral cortex by rosiglitazone

2.5 Western blot 检测胰岛素信号通路中相关蛋白质的表达情况

2.5.1 罗格列酮对 IDE 的影响 IDE 能催化胰岛素降解和负性调控胰岛素信号,同时也能降解可溶性的 A β ,从而调节细胞外的 A β 水平,即胰岛素和 A β 是 IDE 的竞争性底物,此外,胰岛素能反馈调节 IDE 的水平,若中枢胰岛素水平下降则下调 IDE 水平,从而使 A β 的降解减少;若中枢出现胰岛素水平增高,则竞争性抑制 IDE 对 A β 的降解^[9]。因此,通过检测 IDE 的水平可以反应中枢胰岛素的水平和 A β 降解的情况。由图 5 可知:3 组的 IDE 表达水平不完全相同($F=24.618$, $P=0.00$),其中 STZ 组大鼠的 IDE 水平明显减少,与 CON 组比较差异有统计学意义($P<0.001$, $n=3$);RTZ 组大鼠的 IDE 水平较 STZ 组则有所增加($P=0.028$, $n=3$)。

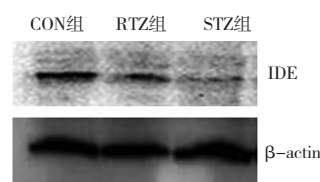


图5 罗格列酮增加 IDE 在 AD 动物模型的表达

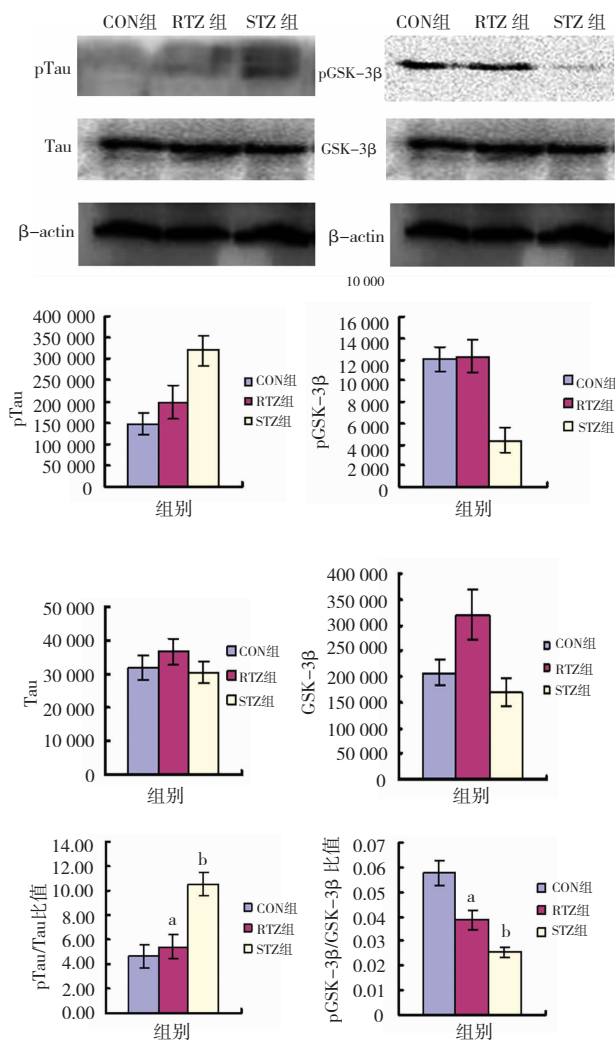
Fig.5 Increase of IDE expressions in AD rat model by rosiglitazone

2.5.2 罗格列酮对 GSK-3 β 活性的影响 GSK-3 β 是胰岛素信号通路中一种重要的激酶,它调控着糖原的合成水平;同时,它也是 Tau 磷酸化的一种重要的激酶,因此,GSK-3 β 的活性高低在一定程度上影响 Tau 磷酸化的水平。由图 6 可知:3 组的 pGSK-3 β /GSK-3 β 的比值不完全相同($F=20.333$, $P=0.002$),其中模型组的 pGSK-3 β 量明显减少,pGSK-3 β /GSK-3 β 的比值明显低于 CON 组($P=0.001$, $n=3$),说明 STZ 组的 GSK-3 β 活性增加,促进了 Tau 蛋白的磷酸化;罗格列酮降低了 GSK-3 β 的活性,与 STZ 组相比差异有统计学意义($P=0.012$, $n=3$)。

2.5.3 Tau 蛋白磷酸化水平的变化 Tau 的过度磷酸化是 AD 的又一个典型病理特征。Tau 被蛋白激酶磷酸化的位点多达 20 个,本文选择了 ser262 位点作为衡量 Tau 磷酸化程度的指标,3 组中总的 Tau 蛋白水平差异无统计学意义,而 pTau/Tau 比值则不完全相同($F=32.735$, $P=0.001$),但 STZ 组 pTau 的水平明显升高,故 STZ 组的 pTau/Tau 比值与 CON 组相比差异有统计学意义($P<0.001$, $n=3$);而罗格列酮则降低了 Tau 蛋白的磷酸化水平,其 pTau/Tau 比值与 STZ 组相比差异有统计学意义($P=0.001$, $n=3$),见图 6。

3 讨论

AD 是老年人最常见的神经退行性疾病,它的致残、致死率极高,多数患者 3~15 年死亡(平均 8



采用 Western blot 的方法检测脑组织中的 pGSK-3β、GSK-3β、pTau 和 Tau 各自的表达水平。然后用 quanty one 软件分析各个条带的密度值,最后计算出 pGSK-3β/GSK-3β 和 pTau/Tau 的比值,从而反应 GSK-3β 的活性和 pTau 水平;a:RTZ 组与 STZ 组相比, $P<0.05$;b:STZ 组与 CON 组相比, $P<0.05$

图 6 罗格列酮降低 ICV-STZ 大鼠的 GSK-3β 活性和 pTau 水平

Fig.6 Reduce of GSK-3β activity and pTau levels of ICV-STZ rats by rosiglitazone

年);是全球致死疾病的第 4 位,仅次于肿瘤、心脏病和脑血管病。到 2005 年为止,全世界共有痴呆病患者约 24 200 000 人,并以每年约 4 600 000 人的速度增加^[7]。据估计,我国 AD 患病人数已超过 500 万,占全世界所有患病人数的 1/4。而且,随着我国人口老龄化进程的加快,这个数字将更为庞大。

3.1 罗格列酮改善 AD 大鼠的认知能力

本文主要观察作为 PPAR γ 激动剂的胰岛素增敏剂罗格列酮对 AD 动物模型认知能力、A β 和 pTau 水平等方面的影响。首先罗格列酮可以明显改

善 AD 动物的学习记忆能力,通过 Morris 水迷宫发现罗格列酮组与模型组相比,从第 2 天就表现出学习能力的增强,这是因为大脑胰岛素的主要功能包括调节机体的能量平衡,突触的可塑性和认知功能以及年龄相关的神经退行性变。因此,作为胰岛素增敏剂的罗格列酮通过改善胰岛素信号通路而发挥胰岛素在中枢的作用。同时,胰岛素抵抗的改善可以增加大脑对葡萄糖的利用,从而增加乙酰辅酶 A 的量,最终使乙酰胆碱的水平升高,而且胰岛素信号通路的改善可以上调胆碱乙酰转移酶的表达^[8],增加乙酰胆碱的量,进而改善胆碱能神经系统功能,提高学习记忆水平。

3.2 罗格列酮能够减少 A β 在大脑皮质的沉积

A β 是由淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 被淀粉样前体蛋白 β 位分解酶 1 (β -site of APP cleaving enzyme, BACE1) 经过一系列蛋白水解反应催化而来,主要包括 A β 1~40 和 A β 1~42,通常认为 A β 的异常积累导致其在大脑的沉积,从而导致神经网络的损害^[9]。胰岛素通过加速 A β 从高尔基体到细胞膜的转运来影响其代谢,另外,胰岛素还可以通过促进 A β 的分泌和竞争 IDE 从而抑制 A β 的降解,增加其在细胞外的水平,同时胰岛素对 A β 代谢的影响也可以通过促分裂素原活化蛋白激酶途径进行调节^[9],因此,胰岛素信号途径的异常影响了 A β 的生理代谢过程。罗格列酮作为胰岛素增敏剂可以降低中枢胰岛素水平,从而增加 IDE 对 A β 的降解,减少 A β 的沉积。有研究^[10]表明,在 AD 患者大脑 IDE 降解 A β 的能力下降了 50%,而对胰岛素的降解仅降低了 30%;在 IDE 基因敲除的小鼠,其大脑 A β 聚集明显增加同时伴有葡萄糖不耐受和血清胰岛素浓度的增加^[11]。罗格列酮作为 PPAR γ 的激动剂,可以调控 IDE 基因的转录,从而增加 IDE 的表达^[12]。但有的研究显示罗格列酮并未增加 IDE 在转基因 AD 动物模型的表达^[13]。当然,PPAR γ 激动剂除了可以增加 A β 的降解,也可以通过降低 BACE1 的表达来减少 A β 的形成^[14]。因此,罗格列酮可以通过影响 A β 的形成和降解两方面来调节 A β 的量。

3.3 罗格列酮减少了 AD 动物大脑的 Tau 的磷酸化水平

Tau 是神经系统非常重要的一种微管相关蛋白,在生理状况下,主要存在神经元轴突内,与微管结合并维持微管的稳定、轴突的生长和信息的传递。研究发现,在 AD 患者大脑中,Tau 至少有 10 个过度磷酸化的位点,异常磷酸化的 Tau 丧失了与微管结合的生物学活性,并在神经元内异常聚集最终

形成神经纤维缠结,进而影响神经元功能。细胞内蛋白质的磷酸化状态都是由蛋白激酶和蛋白磷酸酯酶这 2 种酶之间的活性水平决定,当蛋白激酶活性增加则导致蛋白质的过度磷酸化,GSK-3 β 作为胰岛素信号通路中一种重要的激酶,其活性受胰岛素信号调节,同时 GSK-3 β 与 Tau 的磷酸化有密切联系。本文选择了在 Tau 磷酸化位点中具有代表性的 ser262 作为检测 Tau 磷酸化水平的指标。Western blot 结果显示无论 STZ 组还是 RTZ 组总 Tau 均未见降低,而 RTZ 组的 pTau 的水平则较 STZ 组明显减少,因此,RTZ 组的 pTau/Tau 较 STZ 组降低,表明罗格列酮能够减少 Tau 的过度磷酸化。胰岛素信号通路的损伤抑制了磷脂酰肌醇-3 激酶和蛋白激酶 B 的活性而增加了 GSK-3 β 的活性,进而导致 Tau 蛋白的过度磷酸化^[15]。所以,在 AD 患者,由于胰岛素抵抗引起的氧化性应激过度激活 GSK-3 β ,进一步引起 Tau 蛋白的过度磷酸化,而过度 pTau 蛋白不能被转运至轴索内,相反在神经元核周体积聚和聚集;神经元内 pTau 异常积累增加了氧化性应激,并引起神经纤维退行性变以及诱发一系列病理生理反应,最终导致细胞凋亡的增加、线粒体功能的障碍和坏死。与此同时,有研究表明 A β 可以通过竞争性抑制胰岛素与其受体的亲和力而影响胰岛素信号通路,异常积累的 A β 能干扰胰岛素信号并通过 PI3K/AKT 途径增加 GSK-3 β 的活性,促进 Tau 蛋白的过度磷酸化,最终形成神经纤维缠结(neuro-fibrillary tangles,NFT)^[16]。因此,罗格列酮通过降低 GSK-3 β 的活性及减少 A β 的量来降低 Tau 的磷酸化水平,减少 NFT 的形成维持神经突触的完整性。

通过本实验可知,PPAR γ 激动剂-罗格列酮可以从多方面(还可以改善氧化应激水平,本实验另一部分结果未在本文中列出)作用于 AD 动物模型,因此,PPAR γ 激动剂可以作为治疗 AD 的作用靶点。

参 考 文 献

- [1] Mosconi L, Tsui W H, Rusinek H, et al. Quantitation, regional vulnerability, and kinetic modeling of brain glucose metabolism in mild Alzheimer's disease[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2007, 34(9): 1467-1479.
- [2] Profenno L A, Porsteinsson A P, Faraone S V, et al. Meta-analysis of Alzheimer's disease risk with obesity, diabetes, and related disorders[J]. *Biol Psychiatry*, 2010, 67(6): 505-512.
- [3] Steen E, Terry B M, Rivera E J, et al. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease is this type 3 diabetes? [J]. *J Alzheimers Dis*, 2005, 7(1): 63-80.
- [4] Zhao W Q, Townsend M. Insulin resistance and amyloidogenesis as common molecular foundation for type 2 diabetes and Alzheimer's disease[J]. *Biochim Biophys*, 2009, 1792(5): 482-496.
- [5] Lester-Coll N, Rivera E J, Socia S J, et al. Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes; relevance to sporadic Alzheimer's disease[J]. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2006, 9(1): 13-33.
- [6] 李 焱. 中枢胰岛素抵抗与阿尔茨海默病发病关系的认识[J]. *诊断学理论与实践*, 2009, 8(3): 248-251.
- [7] Li Y. The relation between brain insulin-resistance and Alzheimer's disease [J]. *J Diagn Concepts Pract*, 2009, 8(3): 248-251.
- [8] Reitz C, Brayne C, Mayeux R. Epidemiology of Alzheimer disease [J]. *Nat Rev Neurol*, 2011, 7(3): 137-152.
- [9] Rivera E J, Goldin A, Fulmer N, et al. Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease; link to brain reductions in acetylcholine [J]. *J Alzheimers Disease*, 2005, 8(3): 247-268.
- [10] Gasparini L, Netzer W J, Greengard P, et al. Does insulin dysfunction play a role in Alzheimer's disease? [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2002, 23(6): 288-293.
- [11] Perez A, Morelli L, Cresto J C, et al. Degradation of soluble amyloid h-peptides 1-40, 1-42, and the Dutch variant 1-40Q by insulin degrading enzyme from Alzheimer disease and control brain [J]. *Neurochem Res*, 2000, 25(2): 247-255.
- [12] Farris W, Mansourian S, Chang Y, et al. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid h-protein, and the h-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(7): 4162-4167.
- [13] Du J, Zhang L, Liu S, et al. PPARgamma transcriptionally regulates the expression of insulin-degrading enzyme in primary neurons [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 383(4): 485-490.
- [14] Escribano L, Simón A M, Gimeno E, et al. Rosiglitazone rescues memory impairment in Alzheimer's transgenic mice; mechanisms involving a reduced amyloid and tau pathology [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2010, 35(7): 1593-1604.
- [15] 斯 露, 张 雄, 张红梅, 等. 姜黄素通过激活 PPAR γ 和抑制 BACE1 减少神经细胞内 β 淀粉样蛋白的产生 [J]. *重庆医科大学学报*, 2009, 34(10): 1300-1304.
- [16] Si L, Zhang X, Zhang H M, et al. Curcumin reduces A β generation of neurons by PPAR γ activation and BACE1 inhibition [J]. *Journal of Chongqing Medical University*, 2009, 34(10): 1300-1304.
- [15] Schubert M, Brazil D P, Burks D J, et al. Insulin receptor substrate-2 deficiency impairs brain growth and promotes tau phosphorylation [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(18): 7084-7092.
- [16] de la Monte S M. Insulin resistance and Alzheimer's disease [J]. *BMB Reports*, 2009, 42(8): 475-481.

(责任编辑:冉明会)