

# 链脲佐菌素致阿尔茨海默病模型大鼠脑内 mTOR/P70S6K/IRS-1 信号通路的变化

王 华, 杨 容, 余华荣

(重庆医科大学基础医学院生理学教研室、重庆医科大学神经科学研究中心, 重庆 400016)

**【摘要】目的:**观察侧脑室(intracerebroventricular,ICV)注射链脲佐菌素(streptozotocin,STZ)对大鼠脑内 mTOR/P70S6K/IRS-1 信号通路的影响。**方法:**将 30 只雄性 SD 大鼠随机分为对照组和模型组,每组各 15 只,对照组于第 1 天和第 3 天 ICV 注射生理盐水,模型组于第 1 天和第 3 天侧脑室注射 STZ(ICV-STZ,3 mg/kg)建立 AD 模型。第 1 次注射后 36 d 采用 Morris 水迷宫检测 2 组大鼠空间学习和记忆能力的变化;Western blot 检测 2 组大鼠大脑皮质和海马组织哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin,mTOR)、磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(phosphorylated mammalian target of rapamycin,p-mTORSer<sup>248</sup>)、核糖体 40S 小亚基 S6 蛋白激酶(P70 ribosomal S6 protein kinase,P70S6K)、磷酸化核糖体 40S 小亚基 S6 蛋白激酶(phosphorylated P70 ribosomal S6 protein kinase,p-P70S6KThr<sup>389</sup>)、胰岛素受体底物-1(insulin receptor substrate-1,IRS-1)和磷酸化胰岛素受体底物-1(phosphorylated insulin receptor substrate-1,p-IRS-1Ser<sup>636</sup>)蛋白的表达;HE 染色观察 2 组大鼠大脑皮质和海马组织形态学的改变;甲硫素 S 染色观察 2 组大鼠脑内 A $\beta$  的沉积。**结果:**Morris 水迷宫结果显示 ICV-STZ 能明显降低大鼠目标象限停留时间[对照组:(55.945 $\pm$ 9.447) s,模型组:(31.961 $\pm$ 5.346) s, $t=8.558,P=0.000$ ]和穿越平台次数[对照组:(7.533 $\pm$ 2.560)次,模型组:(2.867 $\pm$ 1.506)次, $t=6.086,P=0.000$ ];HE 染色可见:ICV-STZ 大鼠大脑皮质和海马的部分细胞出现了明显的固缩和肿胀;甲硫素 S 染色发现:在 ICV-STZ 处理后,大鼠脑内出现 A $\beta$  的大量沉积。Western blot 结果表明:ICV-STZ 能同时增加大鼠大脑皮质 p-P70S6KThr<sup>389</sup>[对照组:(0.268 $\pm$ 0.066),模型组:(0.654 $\pm$ 0.079), $t=-8.409,P=0.000$ ]、p-IRS-1Ser<sup>636</sup>[对照组:(0.710 $\pm$ 0.092),模型组:(1.033 $\pm$ 0.135), $t=-4.417,P=0.002$ ]和海马 p-P70S6KThr<sup>389</sup>[对照组:(0.405 $\pm$ 0.064),模型组:(0.732 $\pm$ 0.077), $t=-7.339,P=0.000$ ]、p-IRS-1Ser<sup>636</sup>[对照组:(0.498 $\pm$ 0.093),模型组:(0.836 $\pm$ 0.102), $t=-5.496,P=0.001$ ]蛋白的表达,但不影响大鼠大脑皮质和海马 P70S6K、mTOR、p-mTORSer<sup>248</sup>、IRS-1 蛋白的表达。**结论:**ICV-STZ 能增加大鼠脑内 mTOR/P70S6K/IRS-1 信号通路的激活,提示异常活化的 mTOR/P70S6K/IRS-1 信号通路可能参与了 AD 的发生发展。

**【关键词】**阿尔茨海默病;哺乳动物雷帕霉素靶蛋白;核糖体 40S 小亚基 S6 蛋白激酶;胰岛素受体底物-1

**【中图分类号】**R741.02

**【文献标志码】**A

**【收稿日期】**2014-08-22

## Change of mTOR/P70S6K/IRS-1 signaling pathway in the brain of Alzheimer's disease rats induced by streptozotocin

Wang Hua, Yang Rong, Yu Huarong

(Teaching and Research Section of Physiology, College of Basic Medicine, Research Center of Neuroscience, Chongqing Medical University)

**【Abstract】Objective:** To investigate the effects of intracerebroventricular injection of streptozotocin on mTOR/P70S6K/IRS-1 signaling pathway. **Methods:** The 30 male SD rats were randomly divided into control group and model group, fifteen rats in each group. The rats were treated with saline or streptozotocin (STZ, 3 mg/kg) intracerebroventricularly (ICV) at the 1st day and the 3rd day of the experiment to induce dementia model. Thirty-six days after STZ injection, spatial learning and memory of the rats were determined by Morris water maze test. The expression of mammalian target of rapamycin (mTOR), phosphorylated mTOR (p-mTORSer<sup>248</sup>), p70 ribosomal S6 protein kinase (P70S6K), phosphorylated P70S6K (p-P70S6KThr<sup>389</sup>), insulin receptor substrate-1 (IRS-1) and phosphorylated IRS-1 (p-IRS-1Ser<sup>636</sup>) were measured by Western blot. Morphologic changes of neurons in cere-

作者介绍:王 华, Email:187398458@qq.com,

研究方向:神经生理学。

通信作者:余华荣, Email:1370748729@qq.com。

基金项目:重庆市委前沿与应用基础研究资助项目(编号:cstc2014jcyjA10014);重庆市教委科学技术研究资助项目(编号:KJ130320)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150308.2206.011.html>  
(2015-03-08)

bral cortex and hippocampus were observed by HE staining. Deposition of A $\beta$  in hippocampus was detected by Thioflavin S staining. **Results:** ICV-STZ can significantly reduce the time spent in the target quadrant ( $t=8.558, P=0.000$ ) and numbers of platform location crosses ( $t=6.086, P=0.000$ ). HE staining demonstrated that some cells were clearly shrank and swelled in cerebral cortex and hippocampus of rats treated by STZ. Meanwhile, the deposition of A $\beta$  detected by Thio-flavin S staining was also significantly increased. Compared with that in control group, the expressions of p-P70S6KThr<sup>389</sup> ( $t=-8.409, P=0.000$ ), p-IRS-1Ser<sup>636</sup> ( $t=-4.417, P=0.002$ ) in the cerebral cortex and p-P70S6KThr<sup>389</sup> ( $t=-7.339, P=0.000$ ), p-IRS-1Ser<sup>636</sup> ( $t=-5.496, P=0.001$ ) in hippocampus were increased markedly, while the protein levels of P70S6K, mTOR, p-mTORSer<sup>248</sup> and IRS-1 were not affected by ICV-STZ. **Conclusion:** ICV-STZ results in increased activation of mTOR/P70S6K/IRS-1 signaling pathway, and the increased activation of mTOR/P70S6K/IRS-1 may play important roles in AD pathogenesis.

**【Key words】**Alzheimer's disease; mammalian target of rapamycin; p70 ribosomal S6 protein kinase; insulin receptor substract-1

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种以进行性认知功能障碍和行为损害为特征的神经退行性疾病, 是老年期痴呆的最常见类型, 约占 50%~70%。AD 典型的病理特征包括: 神经元外  $\beta$ -淀粉样蛋白 ( $\beta$ -amyloid protein, A $\beta$ ) 聚集形成的老年斑 (senile plaques, SP)、神经元内高度磷酸化 Tau 蛋白形成的神经纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFTs) 和特定脑区神经元的丢失。其病因不明。

近年来的研究发现: 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 与 AD 关系密切<sup>[1-4]</sup>。如 AD 转基因小鼠在喂食 mTOR 抑制剂雷帕霉素后, 脑内 A $\beta$  的沉积降低, 小鼠的空间学习和记忆能力提高<sup>[1,5]</sup>。但另有研究却发现抑制 mTOR 能促进 AD 的发展<sup>[6-7]</sup>。此外, mTOR 通过磷酸化胰岛素受体底物-1 (insulin receptor substract-1, IRS-1) 丝氨酸位点能引发胰岛素抵抗<sup>[8]</sup>, 而胰岛素抵抗又促进了 AD 的发生<sup>[9]</sup>。本实验拟采用侧脑室 (intracerebroventricular, ICV) 注射链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 建立 AD 大鼠模型, 探讨其脑内 mTOR/P70S6K/IRS-1 信号通路的变化, 以期明确脑内 mTOR/P70S6K/IRS-1 信号通路与 AD 的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 30 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大鼠分成 2 组, 即对照组和模型组, 每组各 15 只。饲养于重庆医科大学 SPF 实验动物中心, 每 5 只 1 笼, 大鼠自由进食和饮水。

1.1.2 实验试剂 STZ 购自 Sigma 公司; 兔抗磷酸化 mTOR 多克隆抗体、兔抗核糖体 40S 小亚基 S6 蛋白激酶 (P70 ribosomal S6 protein kinase, P70S6K) 单克隆抗体和兔抗磷酸化 P70S6K 多克隆抗体购自 Cell Signaling Technology 公司; 小鼠抗  $\beta$ -

actin 多克隆抗体、兔抗 mTOR 多克隆抗体和小鼠抗 IRS-1 多克隆抗体购自碧云天生物公司; 兔抗 IRS-1 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司; 辣根过氧化物酶标记 II 抗购自北京中杉金桥生物公司; ECL 发光液、PVDF 膜购自 Millipore 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 双侧 ICV 注射 STZ 建立 AD 模型 大鼠 ICV 注射方法参考本课题组前期发表的文章<sup>[10]</sup>。

1.2.2 大鼠行为学检测 第 1 次手术后 36 d 采用 Morris 水迷宫进行行为学检测。Morris 水迷宫为 1 个不锈钢的圆柱形水池, 直径 150 cm, 高 50 cm, 水池壁标明 4 个人水点, 盛水后水深约 30 cm, 水温控制在 22  $^{\circ}$ C~25  $^{\circ}$ C, 平台直径 10 cm、高 28 cm。(1) 适应性训练: 第 1 天将平台露出水面, 训练大鼠寻找可见平台。(2) 定位航行实验: 第 2 天至第 6 天为定位航行实验, 平台隐藏在水面下 2 cm, 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, 记录为寻台潜伏期。如果大鼠在 120 s 内不能找到平台, 则由实验者牵引至平台上, 停留 30 s, 擦干全身, 放回笼中, 间隔 15 min 再进行下一轮实验。每只大鼠每天训练 4 次, 连续训练 5 d。此项实验反映大鼠的空间学习能力。(3) 空间探索实验: 定位航行实验完成后 24 h, 撤走平台, 将大鼠从任意 1 个人水点放入池中, 记录其在 120 s 内在目标象限停留时间及穿越平台的次数, 以测试大鼠的记忆保持能力。

1.2.3 动物取材 空间探索实验结束后, 每组随机抽取 7 只, 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠, 剪开胸腹腔, 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% 多聚甲醛灌注至大鼠四肢及尾巴僵硬, 然后迅速取出脑组织, 放入 4% 多聚甲醛固定 24 h, 行甲硫素 S 染色和 HE 染色。其余大鼠采用冰生理盐水快速灌注至肝脏变白, 然后在冰上分离大脑皮质和海马, 放入 -80  $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。

1.2.4 甲硫素 S 染色 将石蜡包埋好的组织进行冠状位切片, 贴片后烘烤。再将片架和玻片一同放入 60  $^{\circ}$ C 二甲苯 I 和 II 中各 20 min 进行脱蜡, 后依次放入不同浓度乙醇各 5 min, 再 0.01 mol/L PBS 洗 3 遍, 每遍 5 min。接着用枸橼酸缓冲液做抗原修复, 待玻片自然冷却至室温, 0.01 mol/L PBS 洗 3 遍, 每遍 5 min。室温下丙酮浸泡玻片 10 min, 后依次用 70% 酒精、80% 酒精、双蒸水各洗 30 s。接着切片再入 0.1% KMnO<sub>4</sub> 染色 30 s, 双蒸水、70% 酒精、80% 酒精各洗 30 s。然后切片在室

温下再入 0.1%甲硫素 S 染色 15 min,80%酒精、70%酒精、双蒸水各洗 30 s 后用甘油封片,在激光共聚焦显微镜下观察照相。

1.2.5 Western blot 组织称重放入无菌玻璃匀浆器中,加入相应裂解液和 PMSF,使裂解液中 PMSF 的浓度为 1 mmol/L,研磨至组织充分裂解,后将匀浆液移入 EP 管中,4 ℃、12 000 × g 离心 15 min,取少量上清液做 BCA 蛋白浓度分析,其余上清液按 4:1 加入 5×蛋白上样缓冲液,100 ℃水中煮沸 5 min 后放入 -80 ℃冰箱中备用。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 PVDF 膜上,Western 封闭液室温封闭 1 h, I 抗(β-actin 1/750,mTOR 1/1 000,p-mTORSer<sup>248</sup> 1:1 000、P70S6K 1/1 000、p-P70S6KThr<sup>389</sup> 1/1 000、IRS-1 1/500 和 p-IRS-1Ser<sup>636</sup> 1/200)4 ℃ 孵育过夜,PBST 洗膜 3 × 10 min, II 抗室温孵育 1 h,PBST 洗膜 3 × 10 min。采用 ECL 发光,暗室压胶片显影定影,然后将压好的胶片进行扫描,通过 Quantity-one 软件进行蛋白条带灰度值分析。

### 1.3 统计学处理

数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,用 SPSS 18.0 软件对各组数据进行正态检验及方差齐性检验(Levene 检验)。其中,定位航行试验中的寻台潜伏期数据采用重复测量方差分析,其余计量资料采用独立样本 *t* 检验。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 Morris 水迷宫结果

2.1.1 定位航行实验 在 5 d 的定位航行训练中,2 组大鼠的平均游泳速度无明显差异,且均表现出一定的学习能力,其寻台潜伏期均呈现逐渐缩短的趋势[对照组第 1 天至第 5 天的寻台潜伏期(s):(48.566 ± 11.501)、(21.756 ± 5.230)、(16.201 ± 5.755)、(14.112 ± 4.604)、(10.756 ± 3.925);模型组第 1 天至第 5 天的寻台潜伏期(s):(61.478 ± 9.918)、(45.570 ± 7.205)、(38.726 ± 9.254)、(32.489 ± 4.609)、(27.296 ± 4.897);(*F*<sub>测试天数</sub>=148.958,*P*=0.000;*F*<sub>测试天数×组别</sub>=2.554,*P*=0.064;*F*<sub>组别</sub>=144.204,*P*=0.000)],见图 1。从定位航行的第 2 天开始,模型组大鼠的寻台潜伏期明显长于对照组(*P*<0.01),见图 1;且主要沿池壁游泳,见图 2。

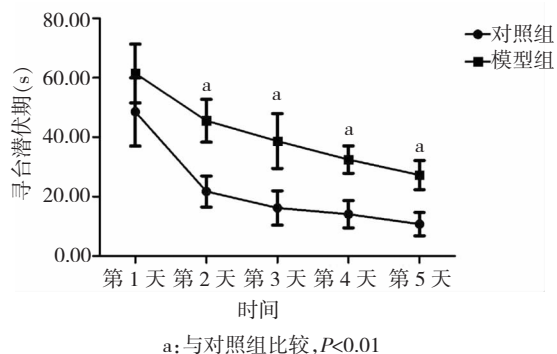
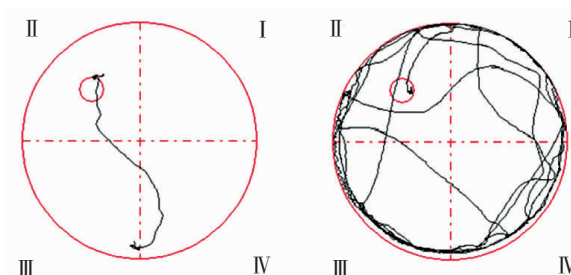


图 1 对照组和模型组大鼠寻台潜伏期的比较 ( $\bar{x} \pm s, n=15$ )  
Fig.1 Comparison of finding platform latency time of rats in control group and model group ( $\bar{x} \pm s, n=15$ )



A. 对照组大鼠寻找平台的游泳轨迹图  
B. 模型组大鼠寻找平台的游泳轨迹图

图 2 对照组和模型组大鼠寻找平台的游泳轨迹图

Fig.2 Locus of finding platform of rats in control group and model group

2.1.2 空间探索实验 第 7 天撤去平台,对照组大鼠在目标象限停留时间较长(55.945 ± 9.447) s,而模型组大鼠在目标象限停留时间明显缩短(31.961 ± 5.346) s。2 组比较,差异有统计学意义(*t*=8.558,*P*=0.000),见图 3。此外,对照组大鼠穿越平台次数[(7.533 ± 2.560)次]也明显多于模型组大鼠[(2.867 ± 1.506)次]。2 组比较,差异有统计学意义(*t*=6.086,*P*=0.000),见图 4。

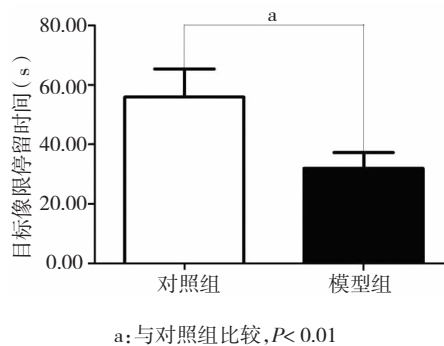


图 3 对照组和模型组大鼠目标象限停留时间的比较 ( $\bar{x} \pm s, n=15$ )

Fig.3 Comparison of the time spent in the target quadrant of rats in control group and model group ( $\bar{x} \pm s, n=15$ )

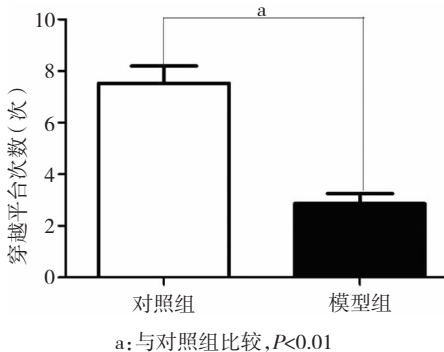


图 4 对照组和模型组大鼠穿越平台次数的比较 ( $\bar{x} \pm s, n=15$ )  
Fig.4 Comparison of number of platform location crosses of rats in control group and model group ( $\bar{x} \pm s, n=15$ )



### 2.2 ICV-STZ 对大鼠大脑皮质和海马形态学的影响

HE 染色显示:模型组大鼠海马和大脑皮质部分细胞明显固缩,还有部分细胞明显肿胀,见图 5。

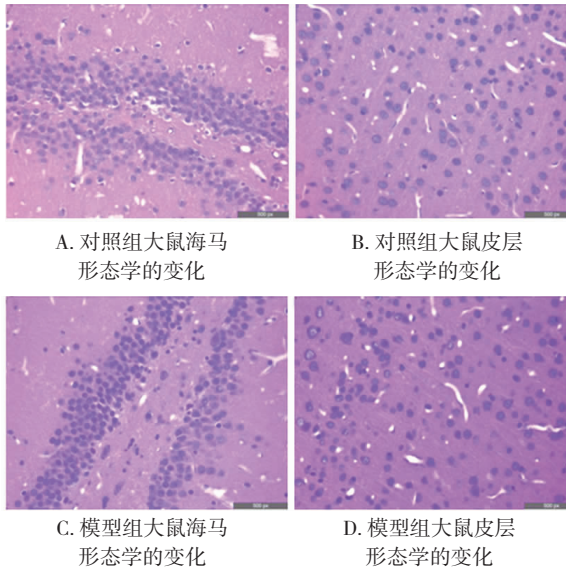


图 5 对照组和模型组大鼠海马和皮层形态学的改变 (HE 染色,400×)

Fig.5 Comparison of morphological changes in hippocampus and cerebral cortex of rats in control group and model group (HE staining,400×)

### 2.3 Aβ 的沉积

甲硫素 S 染色显示:模型组大鼠海马部位出现大量绿色荧光,而对照组大鼠在相应区域几乎未见绿色荧光,见图 6。

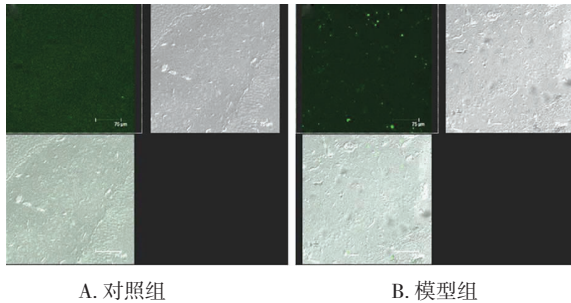
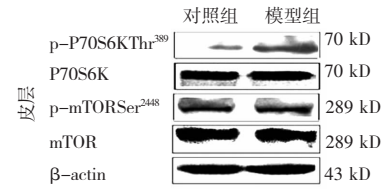


图 6 对照组和模型组大鼠海马 Aβ 沉积 (甲硫素 S 染色,400×)  
Fig.6 Comparison of Aβ deposition in hippocampus of rats in control group and model group (Thioflavin S staining,400×)

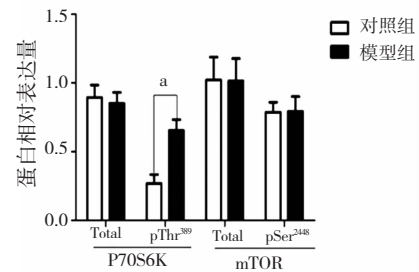
### 2.4 ICV-STZ 对大鼠脑内 mTOR/P70S6K 信号通路的影响

Western blot 结果表明:与对照组相比,ICV-STZ 能明显增加大鼠大脑皮质 p-P70S6KThr<sup>389</sup> 蛋白的表达[对照组:(0.268±0.066),模型组:(0.654±0.079),*t*=-8.409,*P*=0.000],但几乎不影响大鼠大脑皮质 P70S6K[对照组:(0.894±0.090),模型组:(0.852±0.078),*t*=0.789,*P*=0.453]、p-mTORSer<sup>2448</sup>[对照组:(0.787±0.072),模型组:(0.793±0.107),*t*=-0.104,*P*=0.920]和 mTOR[对照组:(1.021±0.167),模型组:(1.015±0.163),*t*=0.065,*P*=0.950]蛋白的表达,见图 7A、B;同时,ICV-STZ 也能明显增加大鼠海马 p-P70S6KThr<sup>389</sup> 蛋白的表达[对照

组(0.405±0.064),模型组(0.732±0.077),*t*=-7.339,*P*=0.000],而几乎不影响大鼠海马 P70S6K[对照组(0.710±0.077),模型组(0.796±0.102),*t*=-1.501,*P*=0.172]、p-mTORSer<sup>2448</sup>[对照组(0.791±0.044),模型组(0.759±0.044),*t*=1.150,*P*=0.283]和 mTOR[对照组(0.980±0.083),模型组(0.973±0.143),*t*=0.097,*P*=0.925]蛋白的表达,见图 7C、D。

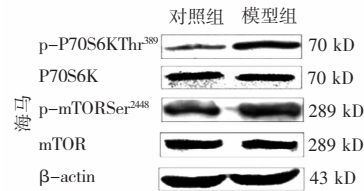


A. 2 组大鼠皮层 p-P70S6KThr<sup>389</sup>、P70S6K、p-mTORSer<sup>2448</sup> 和 mTOR 蛋白的表达

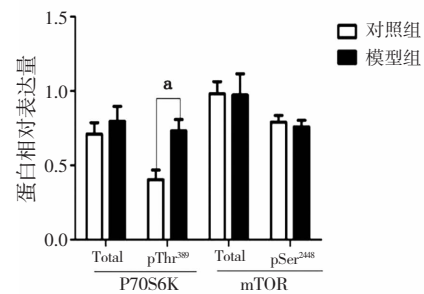


a: 与对照组比较, *P* < 0.01

B. 2 组大鼠皮层 p-P70S6KThr<sup>389</sup>/β-actin、P70S6K/β-actin、p-mTORSer<sup>2448</sup>/β-actin 和 mTOR/β-actin 的蛋白灰度比值 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )



C. 2 组大鼠海马 p-P70S6KThr<sup>389</sup>、P70S6K、p-mTORSer<sup>2448</sup> 和 mTOR 蛋白表达



a: 与对照组比较, *P* < 0.01

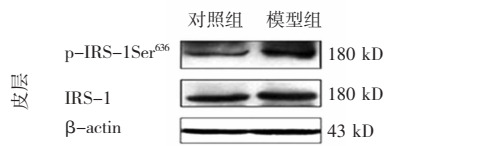
D. 2 组大鼠海马 p-P70S6KThr<sup>389</sup>/β-actin、P70S6K/β-actin、p-mTORSer<sup>2448</sup>/β-actin 和 mTOR/β-actin 的蛋白灰度比值 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

图 7 ICV-STZ 对大鼠皮层和海马 P70S6K、p-P70S6KThr<sup>389</sup>、mTOR 和 p-mTORSer<sup>2448</sup> 蛋白表达的影响 (Western blot)

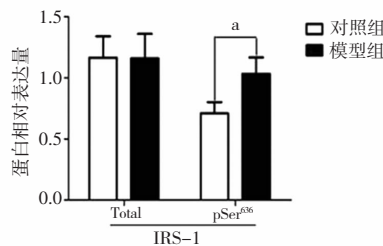
Fig.7 Effect of ICV-STZ on expression of P70S6K, p-P70S6KThr<sup>389</sup>, mTOR and p-mTORSer<sup>2448</sup> in the cerebral cortex and hippocampus (Western blot)

2.5 ICV-STZ 对大鼠脑内 IRS-1 及 p-IRS-1Ser<sup>636</sup> 蛋白表达的影响

Western blot 检测 2 组大鼠脑内 IRS-1 和 p-IRS-1Ser<sup>636</sup> 蛋白的表达。结果发现:与对照组相比,ICV-STZ 几乎不影响大鼠大脑皮质 IRS-1 蛋白的表达[对照组(1.166 ± 0.174),模型组:(1.160 ± 0.201),*t*=0.050,*P*=0.961],但能增加大鼠大脑皮质 p-IRS-1Ser<sup>636</sup> 蛋白的表达[对照组(0.710 ± 0.092),模型组(1.033 ± 0.135),*t*=-4.417,*P*=0.002],见图 8A,B;同时,ICV-STZ 也不影响大鼠海马 IRS-1 蛋白的表达[对照组(1.723 ± 0.135),模型组(1.771 ± 0.133),*t*=-0.567,*P*=0.586],而明显增加大鼠海马 p-IRS-1Ser<sup>636</sup> 蛋白的表达[对照组(0.498 ± 0.093),模型组(0.836 ± 0.102),*t*=-5.496,*P*=0.001],见图 8C、D。

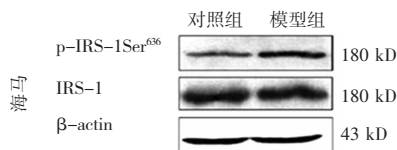


A. 2 组大鼠皮层 p-IRS-1Ser<sup>636</sup> 和 IRS-1 蛋白的表达

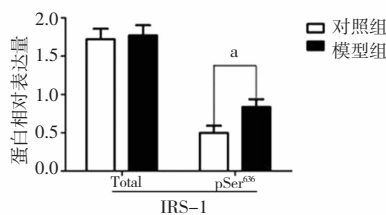


a: 与对照组比较, *P* < 0.01

B. 2 组大鼠皮层 p-IRS-1Ser<sup>636</sup>/β-actin 和 IRS-1/β-actin 的蛋白灰度比值 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )



C. 2 组大鼠海马 p-IRS-1Ser<sup>636</sup> 和 IRS-1 蛋白的表达



D. 2 组大鼠海马 p-IRS-1Ser<sup>636</sup>/β-actin 和 IRS-1/β-actin 的蛋白灰度比值 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

a: 与对照组比较, *P* < 0.01

图 8 ICV-STZ 对大鼠皮层和海马 IRS-1 和 p-IRS-1Ser<sup>636</sup> 蛋白表达的影响 (Western blot)

Fig.8 Effect of ICV-STZ on expression of IRS-1 and p-IRS-1Ser<sup>636</sup> in the cerebral cortex and hippocampus (Western blot)

3 讨论

mTOR 是雷帕霉素在哺乳动物细胞内的靶分子,是一种进化上十分保守丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,属于磷脂酰肌醇激酶相关激酶(the phosphatidylinositol kinase-related kinase,PIKK)超家族。当细胞外环境(如细胞能量状态、营养和应激)发生变化时,mTOR 通过激活其下游效应蛋白 S6K,并磷酸化 S6 核糖体蛋白,参与调节细胞生长、增殖分化以及蛋白质合成等过程<sup>[11]</sup>。Bhaskar 等<sup>[12]</sup>的研究发现: Aβ 寡聚体作为 AD 的主要致病因子,能激活 mTOR 信号的主要调节途径—PI3K/AKT 信号通路,进而增加 mTOR 的活性,而 mTOR 活性的增加又进一步促进了 Aβ 的积聚。对 AD 患者的研究也发现:AD 患者在疾病的不同阶段也表现出 mTOR 信号通路的过度激活<sup>[13]</sup>。

本实验通过给 SD 大鼠 ICV 注射小剂量 STZ,大鼠出现空间学习和记忆能力降低。HE 染色发现:ICV-STZ 6 周后,模型组大鼠脑内出现部分细胞肿胀和固缩,而对照组大鼠脑内未见相应形态学的改变。说明模型组大鼠脑内细胞的损伤并不是由于 ICV 注射这一手术操作损伤所引起,而是由于 STZ 的药物损伤作用所致,这一结果符合以前的文献报道<sup>[14]</sup>。甲硫素 S 染色亦发现:ICV 注射 STZ 6 周后,模型组大鼠脑内出现大量 Aβ 的沉积,而对照组大鼠脑内几乎未见 Aβ 的沉积,这一改变符合 AD 的病理变化。进一步的 Western blot 结果表明:ICV-STZ 能显著增加大鼠脑内 p-P70S6KThr<sup>389</sup> 蛋白的表达,而几乎不影响 P70S6K、mTOR 和 p-mTORSer<sup>2448</sup> 蛋白的表达。这可能是由于 ICV-STZ 能增加脑内 Aβ 的产生,而 Aβ 的增多又能促进 mTOR 的激活(主要表现在 p-P70S6KThr<sup>389</sup> 蛋白表达量的增加),激活的 mTOR 又反过来正反馈促进 Aβ 的生成<sup>[12]</sup>。但是,作为 mTOR 的活性形式-p-mTORSer<sup>2448</sup>,其蛋白表达量却不随 mTOR 的激活而增加。通过查阅文献<sup>[15-17]</sup>得知:p-mTORSer<sup>2448</sup> 虽然是 mTOR 的活性表现形式,但并不能准确的反应 mTOR 活性变化,p-mTOR-Ser<sup>2448</sup> 水平的变化与 mTOR 活性的变化并不一致,而其下游效应蛋白 p-P70S6KThr<sup>389</sup> 才能准确的反应 mTOR 活性的变化。因此,当 AD 模型大鼠脑内出现 mTOR/P70S6K 信号通路激活时,有可能只表现出 p-P70S6KThr<sup>389</sup> 蛋白表达量的增加,而不表现出 p-

mTORSer<sup>2448</sup> 蛋白表达量的增加。本实验结果表明:SD 大鼠 ICV-STZ 6 周后能增加其脑内 mTOR/P70S6K 信号通路的激活,而激活的 mTOR/P70S6K 可能与大鼠脑内 A $\beta$  的沉积密切相关,这符合 Caccamo 等<sup>[5]</sup> 的报道。

那么,脑内 mTOR/P70S6K 信号通路的过度激活会不会促进 AD 样中枢胰岛素抵抗的发生呢?本课题组注意到 mTOR/P70S6K 的作用底物—IRS-1。IRS-1 作为胰岛素信号转导途径中的关键信号分子,其丝氨酸位点(如 Ser616、Ser636、Ser312 等)的磷酸化在促进胰岛素抵抗的发生中起着重要作用<sup>[18]</sup>。mTOR/P70S6K 作为 IRS-1 的重要丝氨酸激酶,能引起 IRS-1 丝氨酸 636 位点的磷酸化,进而促进胰岛素抵抗的发生。Western blot 结果表明:ICV-STZ 能显著增加大鼠脑内 p-IRS-1Ser<sup>636</sup> 蛋白的表达,而几乎不影响大鼠脑内 IRS-1 总蛋白的表达。说明 ICV-STZ 在增加 mTOR/P70S6K 信号通路激活的同时,也增加了 p-IRS-1Ser<sup>636</sup> 蛋白的表达。

综合以上实验结果,本课题组认为:ICV 注射小剂量 STZ 后,随着脑脊液循环,STZ 分布于各个脑区,通过与外周相似的作用机制,作用于特定脑区的胰岛素分泌神经元,抑制胰岛素的分泌,引起特定脑区葡萄糖利用障碍。大脑能量利用障碍,激活了 mTOR。一方面,激活的 mTOR 磷酸化其下游的效应蛋白 p-P70S6KThr<sup>389</sup>,增加 A $\beta$  的合成,而 A $\beta$  的合成增多又正反馈促进 mTOR 的激活。另一方面,激活的 mTOR 又能增加 p-IRS-1Ser<sup>636</sup> 蛋白的表达,抑制正常的胰岛素信号转导,促进胰岛素抵抗的发生。因此,ICV-STZ 后能增加大鼠脑内 mTOR/P70S6K/IRS-1 信号通路的激活,促进中枢胰岛素抵抗,从而引发 AD 样的行为学和病理学的改变。

因此,抑制 mTOR/P70S6K/IRS-1 信号通路的过度激活有可能成为 AD 的治疗靶点。同时,本实验也进一步为应用 ICV-STZ 制作散发性 AD 模型提供了理论基础。

## 参 考 文 献

[1] Spilman P, Podlutskaya N, Hart MJ, et al. Inhibition of mTOR by rapamycin abolishes cognitive deficits and reduces amyloid- $\beta$  levels in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. PLoS One, 2010, 5(4): e9979.

[2] Orr ME, Salinas A, Buffenstein R, et al. Mammalian target of rapamycin hyperactivity mediates the detrimental effects of a high sucrose

diet on Alzheimer's disease pathology[J]. Neurobiol Aging, 2014, 35(6): 1233-1242.

[3] Li X, Alafuzoff I, Soiminen H, et al. Levels of mTOR and its downstream targets 4E-BP1, eEF2, and eEF2 kinase in relationships with tau in Alzheimer's disease brain[J]. FEBS J, 2005, 272(16): 4211-4220.

[4] Lafay-Chebassier C, Paccalin M, Page G, et al. mTOR/p70S6k signalling alteration by Abeta exposure as well as in APP-PS1 transgenic models and in patients with Alzheimer's disease[J]. J Neurochem, 2005, 94(1): 215-225.

[5] Caccamo A, Majumder S, Richardson A, et al. Molecular interplay between mammalian target of rapamycin (mTOR), amyloid- $\beta$ , and Tau: effects on cognitive impairments[J]. J Biol Chem, 2010, 285(17): 13107-13120.

[6] Shang YC, Chong ZZ, Wang S, et al. Prevention of  $\beta$ -amyloid degeneration of microglia by erythropoietin depends on Wnt1, the PI 3-K/mTOR pathway, Bad, and Bcl-xL[J]. Aging (Albany NY), 2012, 4(3): 187-201.

[7] Ma T, Hoeffler CA, Capetillo-Zarate E, et al. Dysregulation of the mTOR pathway mediates impairment of synaptic plasticity in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. PLoS One, 2010, 5(9): e12845.

[8] Um SH, Frigerio F, Watanabe M, et al. Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity[J]. Nature, 2004, 431(7005): 200-205.

[9] Moloney AM, Griffin RJ, Timmons S, et al. Defects in IGF-1 receptor, insulin receptor and IRS-1/2 in Alzheimer's disease indicate possible resistance to IGF-1 and insulin signaling[J]. Neurobiol Aging, 2010, 31(2): 224-243.

[10] 杨文青, 马晶, 刘争, 等. 侧脑室注射链脲佐菌素致大鼠脑内胰岛素通路障碍和认知水平降低[J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(3): 462-468.

[11] Wullschlegel S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism[J]. Cell, 2006, 124(3): 471-484.

[12] Bhaskar K, Miller M, Chludzinski A, et al. The PI3K-Akt-mTOR pathway regulates Abeta oligomer induced neuronal cell cycle events[J]. Mol Neurodegener, 2009(4): 14.

[13] Sun YX, Ji X, Mao X, et al. Differential activation of mTOR complex 1 signaling in human brain with mild to severe Alzheimer's disease[J]. J Alzheimers Dis, 2014, 38(2): 437-444.

[14] Shoham S, Bejar C, Kovalev E, et al. Intracerebroventricular injection of streptozotocin causes neurotoxicity to myelin that contributes to spatial memory deficits in rats[J]. Exp Neurol, 2003, 184(2): 1043-1052.

[15] Das F, Ghosh-Choudhury N, Mahaimathan L, et al. Raptor-ric-tor axis in TGF $\beta$ -induced protein synthesis[J]. Cell Signal, 2008, 20(2): 409-423.

[16] Hay N. The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer[J]. Cancer Cell, 2005, 8(3): 179-183.

[17] Guertin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer[J]. Cancer Cell, 2007, 12(1): 9-22.

[18] Zick Y. Ser/Thr phosphorylation of IRS proteins: a molecular basis for insulin resistance[J]. Sci STKE, 2005, 2005(268): pe4.