

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.02.002

文章编号: 1005-8982(2016)02-0006-07

论著

从 Tau 蛋白过度磷酸化探讨 2 型糖尿病 所致神经纤维化的机制*

马玲

(长江大学附属第一医院 内分泌科,湖北 荆州 434000)

摘要: 目的 观察高血糖对大鼠认知能力和 Tau 蛋白磷酸化程度的影响,从 Tau 蛋白过度磷酸化探讨 2 型糖尿病神经纤维化的机制。**方法** 设定两个干预因素,即 2 型糖尿病造模手段(3 水平:普食喂养、高脂高糖高蛋白饮食、高脂高糖高蛋白饮食并腹腔注射小剂量链脲佐菌素)和药物干预(2 水平:无处置、罗格列酮片按照 3.0 mg/(kg·d)灌胃 4 周)。48 只 SD 大鼠分为 6 组。Morris 水迷宫检测大鼠认知能力;葡萄糖氧化酶法检测血浆血糖;放射免疫法检测血浆胰岛素;胰岛素抵抗指数 HOMA-IR 评估胰岛素抵抗程度;高效液相色谱法检测海马谷氨酸浓度;ELISA 检测海马 p-PHF1^{Ser396/404}、p-AT8^{Ser199/202}、p-12E8^{Ser262} 的表达。**结果** 胰岛素抵抗和 2 型糖尿病造成认知障碍,罗格列酮可缓解认知障碍;胰岛素抵抗和 2 型糖尿病可明显增加海马中血糖(Glu)浓度,罗格列酮可减少 Glu 浓度;胰岛素抵抗和 2 型糖尿病可增加海马中磷酸化 Tau 蛋白的表达;罗格列酮可减少海马中磷酸化 Tau 蛋白的表达。**结论** 胰岛素抵抗及血糖升高可能是 2 型糖尿病时海马 Tau 蛋白过度磷酸化的原因;罗格列酮可以缓解这一过程。

关键词: 2 型糖尿病;阿尔茨海默病;Tau 蛋白;过度磷酸化;罗格列酮

中图分类号: R587.2

文献标识码: A

Hyperphosphorylation of tau and mechanism of neural fibrosis of type 2 diabetes*

Ling Ma

(Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Yangtze
University, Jingzhou, Hubei 434000, China)

Abstract: Objective To observe the effect of high blood sugar on cognitive ability of rats and the degree of phosphorylation of tau protein in the hippocampus, in order to investigate the mechanism of neural fibrosis in type 2 diabetes. **Methods** Two intervention factors were set in this study. One was type 2 diabetes modeling method which included 3 levels, i.e. general diet, high-fat high-sugar high-protein diet, and high-fat high-sugar high-protein diet with intraperitoneal injection of small dose of Streptozotocin. The other was drug intervention in 2 levels: no disposal, and 4-week gavage of Rosiglitazone tablets at a dose of 3.0 mg/kg/d. Forty-eight SD rats were divided into 6 groups. Morris water maze was used to test the cognitive ability of the rats. Plasma glucose was determined by glucose oxidase method. The plasma insulin was determined by radioimmunoassay. The degree of insulin resistance was evaluated by HOMA-IR. The concentration of glutamic acid in hippocampus was determined by HPLC. The expressions of p-PHF1^{Ser396/404}, p-AT8^{Ser199/202}, p-12E8^{Ser262} in the hippocampus were determined by ELISA. **Results** Insulin resistance and type 2 diabetes could cause cognitive impairment. Rosiglitazone alleviated cognitive impairment. Insulin resistance and type 2 diabetes significantly increased the concentration of glutamic acid in the hippocampus. Rosiglitazone reduced the concentration of glutamic acid. The insulin resistance and type 2 diabetes increased the phosphorylation of tau protein

收稿日期:2015-08-01

* 基金项目:中国博士后科学基金面上项目(No:2013M530880)

• 6 •

in the hippocampus. Rosiglitazone reduced the expression of phosphorylated tau protein in the hippocampus.

Conclusions Insulin resistance and elevated blood sugar may be the causes of phosphorylation of tau protein in the hippocampus of type 2 diabetic rats. Rosiglitazone can mitigate this process.

Keywords: type 2 diabetes; Alzheimer's disease; tau protein; hyperphosphorylation; Rosiglitazone

糖尿病是由于胰岛素相对或者绝对缺乏以及各种原因诱发胰岛素抵抗引起的临床综合征,患者的碳水化合物、蛋白质和脂肪代谢发生紊乱,表现为持续的高血糖状态。而且,随病程延长,糖尿病患者可出现微血管病变,继而引发神经损伤。研究发现,糖尿病常伴有认知功能障碍或者痴呆,如阿尔茨海默病(alzheimer disease, AD)^[1]和血管性痴呆(vascular dementia, VD)^[2],尤其多见于病程较长的 2 型糖尿病患者。研究者推测,在糖尿病所致认知障碍的发病机制与胰岛素水平、胰岛素抵抗和葡萄糖代谢异常等关系密切。2 型糖尿病(type 2 diabetes)^[3]的病理基础是胰岛素抵抗,是以主要临床特征为高血糖和高胰岛素血症的内分泌代谢性疾病。糖尿病性脑病是 2 型糖尿病患者的主要并发症,其发病原因与细胞内信号传导途径受损有关。

AD 是慢性进行性认知障碍为主要表现的中枢神经退行性疾病,其典型病理变化是 Tau 蛋白(Tau proteins)过度磷酸化导致的(neurofibrillary tangles, NFT)和神经元丢失及 β 淀粉样蛋白(amyloid β -protein, A β)^[4]积聚,临床特征为记忆减退、认知障碍和人格改变。

Tau 蛋白^[5]是神经元胞浆内的微管相关蛋白,其正常 Tau 蛋白的生物学活性主要体现在与管蛋白的结合形成微管及与已经形成的微管结合以维持其稳定性,并参与维持细胞形态、轴突信息传递^[6]、细胞分裂等生理活动。正常成熟脑内 Tau 蛋白磷酸化位点较少,平均每分子含 2~3 个磷酸基团。在 AD 患者神经系统中, Tau 蛋白发生过度磷酸化,不仅失去其生物学功能而且易聚集成 PHF 结构,还能成为毒性分子,猎取正常的微管相关蛋白,使微管结构崩解,神经元退化。因此, Tau 蛋白的过度磷酸化被认为是 AD 致病过程中的关键因素,称为“阿茨海默病样(alzheimer-like, AD-like)改变”^[7]。

Tau 蛋白的磷酸化程度取决于蛋白激酶和蛋白磷酸酯酶的活性^[8],糖原合成激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)^[9]、周期蛋白依赖性激酶和丝裂原激活蛋白激酶均能使 Tau 蛋白过度

磷酸化。其中, GSK-3 β 既是 Tau 蛋白的重要磷酸激酶,又在胰岛素信号转导途径位于磷脂酰肌醇-3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI-3K)的下游。神经元主要靠葡萄糖来提供能量^[10],外周胰岛素水平下降或胰岛素受体敲除后,胰岛素信号转导途径下调,导致下游中 PI-3K 活性下降,而 PI-3K 可通过自身活性下降来导致下游的 Tau 蛋白磷酸化的主要激酶 GSK-3 β 由非活化型转变为活化型,由此出现 Tau 蛋白 AD 样改变。

本研究以 2 型糖尿病患者为研究对象,首先观察 2 型糖尿病大鼠 Tau 蛋白磷酸化程度,然后从胰岛素抵抗导致胰岛素转导信号下调及葡萄糖代谢受损等两个方面对 Tau 蛋白过度磷酸化机制进行探讨,进而使用马来酸罗格列酮^[11]治疗 2 型糖尿病患者,检测海马 Tau 蛋白的磷酸化程度,并探究其逆转 Tau 蛋白的过度磷酸化的机制,揭示 2 型糖尿病作为 AD 发病的风险因子的具体机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂及仪器 马来酸罗格列酮(Rosiglitazone Maleate, 葛兰素史克天津有限公司),链脲佐菌素(Streptozotocin, STZ, 美国, Sigma 公司), Rg-1 单体(Rg-1, 纯度 >98%, 芜湖贰而塔医疗科技有限公司),氯化锂(Lithium, 纯度 >97%, 上海实验试剂有限公司),纯品 L-谷氨酸(L-Glutamic acid, 美国 Sigma 公司),兔抗人 p-AT8^{Ser202} 单克隆抗体(美国 Gene Tex 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), SM600 全自动酶标仪(上海永创医疗器械有限公司)。

1.1.2 实验动物 备选 24 周健康雄性 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。将实验大鼠置通风良好处, 12 h 明暗交替, 自由饮水摄食, 每日触摸 2 min, 使大鼠适应实验室环境和操作。

1.2 实验方法

实验按美国医学研究协会《实验动物处理原则》及美国科学学会和国家卫生研究院《实验动物使用和处理指南》进行。

1.2.1 实验动物分组和干预 实验设计采用 3×2 析因设计,即按随机单位组设 2 个干预因素,即 2 型糖尿病造模手段(3 水平:普食喂养、高脂高糖高蛋白饮食、高脂高糖高蛋白饮食并腹腔注射小剂量链脲佐菌素)和药物干预(2 水平:无处置、罗格列酮片按照 3.0 mg/kg/d 灌胃 4 周)。

1.2.2 实验动物干预措施 将 48 只大鼠随机分 6 个实验组,每组 8 只: I 组(普食喂养); II 组(普食喂养 + 罗格列酮片按照 $3.0 \text{ mg/(kg} \cdot \text{d)}$ 灌胃 4 周); III 组(高脂高糖高蛋白饮食); IV 组(高脂高糖高蛋白饮食 + 罗格列酮片按照 $3.0 \text{ mg/(kg} \cdot \text{d)}$ 灌胃 4 周); V 组(高脂高糖高蛋白饮食并腹腔注射小剂量链脲佐菌素); VI 组(高脂高糖高蛋白饮食并腹腔注射小剂量链脲佐菌素 + 罗格列酮片按照 3.0 mg/kg/d 灌胃 4 周)。造模过程结束后测试实验大鼠的空腹血糖。

1.2.3 大鼠胰岛素抵抗模型和 2 型糖尿病模型制作 本研究将胰岛素抵抗和葡萄糖水平增高分别进行研究,因此造以下两种模型:一种为胰岛素抵抗大鼠模型,这种模型仅具备胰岛素抵抗特征,但血糖水平正常;另一种模型为 2 型糖尿病模型,这种模型具备胰岛素抵抗及血糖水平升高特征。适应性饲养 1 周后,建立大鼠 2 型糖尿病模型和胰岛素抵抗模型:雄性 SD 大鼠 48 只,其中 32 只大鼠高脂高糖高蛋白饮食(热卡百分比为碳水化合物 26.0%,蛋白质 15.2%,脂肪 58.8%),另外 16 只大鼠设为对照组,接受正常饮食。8 周后,随机从高脂高糖高蛋白饮食组中取 16 只,按照 $20 \sim 25 \text{ mg/kg}$ 剂量腹腔注射链脲佐菌素(Streptozocin, STZ; Sigma 公司,粉剂溶于 0.1 mol/L pH 4.3 柠檬酸钠缓冲液中,每只大鼠注射 1.5 ml),72 h 后尾静脉取血,血糖仪(美国强生公司)测血糖 $\geq 16.7 \text{ mmol/L}$ 、尿糖持续阳性为造模成功,为 2 型糖尿病模型;余 16 只高脂高糖高蛋白饮食大鼠为胰岛素抵抗模型,胰岛素抵抗模型组和对照组实验大鼠腹腔注射柠檬酸缓冲液 1.5 ml。实验动物数量说明:16 只大鼠接受 2 型糖尿病模型造模,其中造模成功者 14 只;随即另选取 2 只大鼠进行 2 型糖尿病模型造模,2 只造模均成功,补入相应实验组。

1.2.4 大鼠胰岛素抵抗模型和 2 型糖尿病模型制作 大鼠胰岛素抵抗模型和 2 型糖尿病模型的制作完

成后,进行模型质量检测,即使用葡萄糖氧化酶法检测血浆血糖、放射免疫法检测血浆胰岛素、胰岛素抵抗指标以稳态模型的胰岛素抵抗指数 HOMA-IR (homeostasis model assessment-IR, HOMA-IR) = 空腹胰岛素 (fasting insulin, FINs, IU/L) \times 空腹血糖 (fasting blood-glucose, FPG, mmol/L) / 22.5 表示^[12],排除模型制作失败的大鼠。

1.2.5 罗格列酮处置 动物模型制作成功并经过检测后,罗格列酮处理组用罗格列酮片按照 3.0 mg/kg/d 灌胃 4 周(罗格列酮片由葛兰素史克天津有限公司提供),72 h 后,断颈处死大鼠。实验过程中自由饮水、进食,均未经任何降糖药物处理。

1.2.6 Morris 水迷宫(Morris water maze, MWM)视频分析系统检测大鼠的认知^[13] 实验干预措施结束 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。水迷宫内盛自来水,加墨汁浑浊,检测前将平台置于 I 象限水面下 2 cm。所有实验在 9 Am ~ 3 Pm 进行,室内安静,物品放置及灯光状态一致,水温(24 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 。Morris 1.0 软件跟踪记录分析相关数据。1 ~ 6 d 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 1 ~ 6 d 逃避潜伏期的平均值作为学习成绩,其越短显示学习能力越好。

第 7 天空间探索实验:撤除平台,将大鼠从距原平台最远 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,其越长显示记忆能力越好。

1.2.7 取材 在 Morris 水迷宫测试结束后 24 h 内取实验大鼠的海马组织,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 冰面上吸除血迹,分离双侧海马。左侧海马用锡箔纸标记包裹后置于液氮中过夜,置入 -80°C 冰箱超低温保存,备做 Western blot 检测;右侧海马称重,加入 1 ml 甲醇-水离心液,低温匀浆,取部分匀浆液 4°C , $10\,000 \times g$,离心 15 min,取上清液,滤膜过滤后置入 -80°C 冰箱冷冻保存待测血糖(Glu)的含量(以 $\mu\text{g/g}$ 计)。

1.2.8 高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 检测 Glu 在海马中含量

检测样品:处理好的为大鼠右侧海马组织匀浆上清液。色谱条件:18-ODS 色谱柱柱温 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%)(0,45%)(1,65%)(6,75%)(20,45%)。流动相经 0.45 μm 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。氨基酸标准液的配制:Glu 标准品配成 100 μmol/L 的标准溶液,测前稀释。衍生及分析:取 100 μl 标准液或者组织样品液于 EP 管中,加入 100 μl 衍生试剂反应 2 min 后进样 20 μl。Glu 标准曲线的建立:配制浓度分别为 0.150、0.300、0.735、1.470、2.940、3.675 和 5.880 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。海马中 Glu 含量的测定:对海马组织匀浆上清液解冻,加入冰冻的甲酸(1 mol/L, 2 ml),冰浴下匀浆。将匀浆液于 4℃ 7 000 r/min 离心 30 min。取上清液置于 20℃ 冰箱保存。每 1 ml 脑组织匀浆上清液加 0.75 ml 4% 的碳酸氢钠溶液混匀,4℃ 3 000 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,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℃ 下静置 3 min 后进样,梯度洗脱,测定 Glu 含量。

1.2.9 酶联免疫吸附剂测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 法检测 p-PHF1^{Ser396/404}、p-AT8^{Ser199/202}、p-12E8^{Ser262} 的表达 取左侧海马,匀浆,取 0.2 g, 1 000 × g 离心 20 min,取上清液即可检测。标本应清澈透明,悬浮物应离心去除。标本收集后若不及时检测,请按一次使用量分装,置于 -20℃ -80℃ 冰箱冷冻保存待测。采用双抗体夹心 ELISA 法。将抗体包被于酶标板上,实验时标本或标准品中的 Tau 蛋白会与包被抗体结合,游离的成分被洗去。

依次加入生物素化的抗 Tau 蛋白抗体和辣根过氧化物酶标记的亲合素,抗 Tau 蛋白抗体与结合在包被抗体结合、生物素与亲合素特异性结合而形成免疫复合物,洗去游离成分,加入显色底物。用酶标仪在 450 nm 波长处测光密度(optical density, OD)值, Tau 蛋白浓度与 OD450 值间呈正比,通过绘制标准曲线求出标本中 Tau 蛋白浓度。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行数据分析,计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,对各组样本行方差齐性检验,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;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, $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 实验大鼠的认知能力:逃避潜伏期(EL)和空间探索时间(SET)

血糖水平增高和胰岛素抵抗可造成认知障碍,即延长逃避潜伏期($F=56.414, P=0.009$)并缩短空间探索时间($F=37.705, P=0.004$)(见表 1、2);马来酸罗格列酮可减轻胰岛素抵抗和葡萄糖水平增高造成的认知障碍程度(逃避潜伏期 $F=119.820, P=0.011$)(空间探索时间 $F=63.363, P=0.001$)(见表 1、2)。

2.2 HPLC 法检测神经递质 Glu 在海马中含量

血糖水平增高和胰岛素抵抗可明显增加海马中 Glu 浓度($F=67.945, P=0.003$);马来酸罗格列酮可减少血糖水平增高和胰岛素抵抗导致的海马 Glu 浓度的上调幅度($F=33.012, P=0.015$)(见表 3)。

2.3 酶联免疫吸附剂测定检测 Tau-5、p-PHF1^{Ser396/404}、p-AT8^{Ser199/202} 在大鼠海马中的表达

从表 4~5 可见,血糖水平增高和胰岛素抵抗

表 1 Morris 水迷宫认知成绩比较:逃避潜伏期 ($s, n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	马来酸罗格列酮	无治疗	合计	F 值	P 值
空白对照组	35.59 ± 4.61	36.05 ± 4.05	35.92 ± 7.24	1.882	0.439
血糖水平增高组	49.35 ± 3.72	56.12 ± 4.53	54.95 ± 6.02	59.510	0.001
胰岛素抵抗组	45.22 ± 4.34	50.43 ± 9.57	48.01 ± 11.03	62.132	0.006
合计	43.95 ± 7.10	58.44 ± 18.25	51.62 ± 17.23	119.820 ¹⁾	0.011 ¹⁾
F 值	25.693	54.181	56.414 ¹⁾		
P 值	0.001	0.000	0.009 ¹⁾	62.002 ²⁾	0.001 ²⁾

注:1)主效应的 F 统计量和 P 值;2)交互效应的 F 统计量和 P 值

Tau 蛋白的磷酸化程度 (p-PHF1^{Ser396/404}: $F=63.061$, $P=0.001$)、(p-AT8^{Ser199/202}: $F=74.503$, $P=0.002$); 马来酸罗格列酮下调 Tau-5 增加的幅度 ($F=29.124$, $P=0.026$) 和 Tau 蛋白的磷酸化的程度 (p-PHF1^{Ser396/404}: $F=9.264$, $P=0.012$)、(p-AT8^{Ser199/202}: $F=14.752$, $P=0.004$)。

表 2 Morris 水迷宫认知成绩比较: 空间探索时间 ($s, n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	马来酸罗格列酮	无治疗	合计	F 值	P 值
空白对照组	31.31 ± 6.13	30.19 ± 1.62	30.63 ± 9.59	3.327	0.565
血糖水平增高组	19.99 ± 1.68	15.74 ± 1.95	17.12 ± 3.15	22.076	0.000
胰岛素抵抗组	22.85 ± 4.71	17.83 ± 1.36	20.02 ± 8.21	56.686	0.000
合计	26.90 ± 8.87	22.97 ± 5.02	24.98 ± 8.51	99.931 ¹⁾	0.010 ¹⁾
F 值	40.051	39.656	37.705 ¹⁾		63.363 ²⁾
P 值	0.000	0.000	0.004 ¹⁾		0.001 ²⁾

注: 1) 主效应的 F 统计量和 P 值; 2) 交互效应的 F 统计量和 P 值

表 3 Glu 在大鼠海马组织中的含量 ($n=8, \mu \text{ mol/gprot}, \bar{x} \pm s$)

组别	马来酸罗格列酮	无治疗	合计	F 值	P 值
空白对照组	48.85 ± 7.86	50.04 ± 5.72	49.55 ± 8.95	2.048	0.591
血糖水平增高组	69.92 ± 8.63	100.32 ± 26.81	85.77 ± 53.82	115.131	0.000
胰岛素抵抗组	57.53 ± 5.27	86.98 ± 24.11	71.85 ± 42.73	55.209	0.000
合计	59.55 ± 8.31	74.78 ± 22.24	66.96 ± 32.12	273.154 ¹⁾	0.003 ¹⁾
F 值	10.152	35.001	67.945 ¹⁾		
P 值	0.008	0.012	0.003 ¹⁾	33.012 ²⁾	0.015 ²⁾

注: 1) 主效应的 F 统计量和 P 值; 2) 交互效应的 F 统计量和 P 值

表 4 p-PHF1^{Ser396/404} 蛋白在大鼠海马中的含量 ($n=8, \text{ng/L}, \bar{x} \pm s$)

组别	马来酸罗格列酮	无治疗	合计	F 值	P 值
空白对照组	229.25 ± 43.76	236.13 ± 38.72	230.69 ± 68.11	25.765	0.000
血糖水平增高组	271.50 ± 27.63	315.13 ± 26.43	291.31 ± 35.18	11.392	0.015
胰岛素抵抗组	255.13 ± 29.80	296.33 ± 24.93	273.63 ± 33.32	8.062	0.023
合计	253.63 ± 30.30	240.45 ± 75.08	248.54 ± 70.98	45.946 ¹⁾	0.000 ¹⁾
F 值	13.984	58.481	63.061 ¹⁾		
P 值	0.009	0.002	0.001 ¹⁾	9.264 ²⁾	0.012 ²⁾

注: 1) 主效应的 F 统计量和 P 值; 2) 交互效应的 F 统计量和 P 值

表 5 p-AT8^{Ser199/202} 蛋白在大鼠海马中的含量 ($n=8, \text{ng/L}, \bar{x} \pm s$)

组别	马来酸罗格列酮	无治疗	合计	F 值	P 值
空白对照组	502.63 ± 56.09	511.50 ± 166.67	506.06 ± 289.46	67.108	0.000
血糖水平增高组	591.63 ± 35.40	633.63 ± 73.54	605.86 ± 92.14	64.643	0.000
胰岛素抵抗组	543.88 ± 26.69	580.25 ± 67.32	565.55 ± 106.46	75.696	0.000
合计	548.99 ± 93.23	583.03 ± 144.66	565.92 ± 165.53	174.481 ¹⁾	0.000 ¹⁾
F 值	96.442	44.155	74.503 ¹⁾		
P 值	0.000	0.028	0.002 ¹⁾	14.752 ²⁾	0.004 ²⁾

注: 1) 主效应的 F 统计量和 P 值; 2) 交互效应的 F 统计量和 P 值

3 讨论

本研究运用胰岛素抵抗及 2 型糖尿病模型大鼠作为研究对象,研究这两种病理状态下血清 Tau 蛋白磷酸化修饰程度的变化。本研究检测这两种动物模型大脑血清 Tau 蛋白的磷酸化修饰程度,即检测 Tau 蛋白在 p-PHF1^{Ser396/404}、p-AT8^{Ser199/202}、p-12E8^{Ser262} 等 4 个位点的磷酸化水平,发现在 2 型糖尿病模型和胰岛素抵抗模型大鼠的海马组织中所检测的 4 个位点均发生过度磷酸化改变,而且 2 型糖尿病模型大鼠海马内 Tau 蛋白的过度磷酸化程度较胰岛素抵抗模型大鼠为重。本研究更为重要的发现是,马来酸罗格列酮可下调 Tau 蛋白的过度磷酸化的程度。

Tau 蛋白的磷酸化受蛋白激酶和蛋白磷酸酯酶的双重调控^[14],GSK-3 β 、周期蛋白依赖性激酶(cyclin activated protein kinases,CDK)和丝裂原激活蛋白激酶(mitogen activated protein kinases,MAPK)可促使 Tau 蛋白磷酸化。Ribeiro 等^[15]发现,胰岛素和 IGF-1 可以通过 PI-3K/Akt 信号通路提高受试者的线粒体功能,进而改善受试者由亨廷顿氏病造成的行为障碍。此外,Bartl 课题组发现^[16],在体外培养人神经元观察到外周胰岛素水平下降可以抑制 PI-3K 的活性,而 PI-3K 可通过自身活性下降来导致下游的 GSK-3 β 由非活化型转变为活化型,从而 Tau 蛋白在 p-PHF1^{Ser396/404}、p-AT8^{Ser199/202}、p-12E8^{Ser262} 等位点发生磷酸化。本研究选用的胰岛素抵抗及 2 型糖尿病模型大鼠可能由于胰岛素抵抗的原因,细胞内胰岛素信号传导途径下调后导致 Tau 蛋白磷酸化的重要激酶活性升高,最终 Tau 蛋白在蛋白激酶 GSK-3 β 的作用下呈现过度磷酸化改变。

综上所述,本实验发现在糖尿病模型中大脑血清 Tau 蛋白是过度磷酸化的,胰岛素抵抗导致的信号传导障碍及异常的葡萄糖代谢可能参与 Tau 蛋白异常过度磷酸化的表达。该结果为 2 型糖尿病作为 AD 的风险因素提供理论依据,即有理由相信,胰岛素抵抗和 2 型糖尿病通过上调海马内 Tau 蛋白在 p-PHF1^{Ser396/404}、p-AT8^{Ser199/202}、p-12E8^{Ser262} 等多个位点的过度磷酸化程度,进而干扰海马神经元轴突神经递质的分泌和转运,造成大鼠海马神经元轴突的生理功能障碍,最终导致海马的认知功能紊乱和学习

记忆障碍。

参 考 文 献:

- [1] Shoji M. Alzheimer's disease: a type of cerebral amyloidosis[J]. Brain Nerve, 2014, 66(7): 837-847.
- [2] Mangat GS, Jaggi AS, Singh N. Ameliorative effect of a selective endothelin eta receptor antagonist in rat model of l-methionine-induced vascular dementia [J]. Korean J Physiol Pharmacol, 2014, 18(3): 201-209.
- [3] Demir M, Oba E, Senoz H, et al. Retinal nerve fiber layer and ganglion cell complex thickness in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Indian J Ophthalmol, 2014, 62(6): 719-720.
- [4] Wang X, Yu SL, Gao SJ, et al. Insulin inhibits A β production through modulation of APP processing in a cellular model of Alzheimer's disease[J]. Neuro Endocrinol Lett, 2014, 35(3): 224-229.
- [5] Dopfer EG, Rombouts SA, Jiskoot LC, et al. Structural and functional brain connectivity in presymptomatic familial frontotemporal dementia[J]. Neurology, 2014, 83(2): 19-26.
- [6] Na ES, Nelson ED, Adachi M, et al. A mouse model for MeCP2 duplication syndrome: MeCP2 overexpression impairs learning and memory and synaptic transmission [J]. J Neurosci, 2012, 32(9): 3109-3117.
- [7] Choi JK, Oh HM, Lee S, et al. Salvia plebeia suppresses atopic dermatitis-like skin lesions[J]. Am J Chin Med, 2014, 42(4): 967-985.
- [8] Peng Y, Hu Y, Xu S, et al. Potassium 2- (1-hydroxypentyl) - benzoate improves memory deficits and attenuates amyloid and τ pathologies in a mouse model of alzheimer's disease[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2014, 350(2): 361-374.
- [9] Palm R, Chang J, Blair J, et al. Down-regulation of serum gonadotropins but not estrogen replacement improves cognition in aged-ovariectomized 3xTg AD female mice[J]. J Neurochem, 2014, 130(1):115-125.
- [10] Lee CH, Won MH. Change of peroxisome proliferator-activated receptor γ expression pattern in the gerbil dentate gyrus after transient global cerebral ischemia[J]. Anat Cell Biol, 2014, 47(2): 111-116.
- [11] Ji F, Ma D, Liu Z, et al. Rosiglitazone amplifies the sensitivity of docetaxel and reduces the expression of CD44v6 [J]. Oncol Lett, 2014, 7(4): 1284-1288.
- [12] Liu J, Wu YY, Huang XM, et al. Ageing and type 2 diabetes in an elderly chinese population: the role of insulin resistance and beta cell dysfunction [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2014, 18(12): 1790-1797.
- [13] Wang C, He L, Yan M, et al. Effects of polyphenols from pine needles of Pinus massoniana on ameliorating cognitive impairment in a D-galactose-induced mouse model [J]. Age (Dordr), 2014, 36(4): 9676.

- [14] 刘超, 闵苏, 刘东, 等. 丙泊酚和地卓西平马来酸逆转抑郁大鼠电休克后的 Tau 蛋白过度磷酸化 [J]. 上海医学, 2014, 37(2): 139-142.
- [15] Ribeiro M, Rosenstock TR, Oliveira AM, et al. Insulin and IGF-1 improve mitochondrial function in a PI-3K/Akt-dependent manner and reduce mitochondrial generation of reactive oxygen species in Huntington's disease knock-in striatal cells[J]. Free Radic Biol Med, 2014, 74(9): 129-144.
- [16] Bartl J, Meyer A, Brendler S, et al. Different effects of soluble and aggregated amyloid β 42 on gene/protein expression and enzyme activity involved in insulin and APP pathways[J]. J Neural Transm, 2013, 120(1): 113-120.

(张蕾 编辑)

《中国现代医学杂志》投稿须知

《中国现代医学杂志》创刊于 1991 年, 期刊号 ISSN1005-8982/CN43-1225/R, 半月刊, 系中国科技论文统计源期刊、北京大学图书馆中文核心期刊、中国核心学术期刊(RCCSE)(A-)及湖南省十佳期刊, 被中国知网、万方数据库、超星域出版、美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)等国内外多个检索系统收录, 公开发刊。本刊是中华人民共和国教育部主管的国家级综合性医学学术期刊, 以服务于广大医药卫生科技人员, 促进国内外医学学术交流和医学事业发展为宗旨。由中南大学、中南大学肝胆肠外科研究中心主办, 中南大学湘雅医院承办。

本刊刊登的论文内容涉及基础医学、临床医学、预防医学及医学相关学科的新理论、新技术、新成果以及医学信息、动态等。文稿须具有科学性、创新性、实用性。文字要求准确、通顺、精练。本刊设论著、临床论著、综述、新进展研究、临床报道、学术报告、病例报告等栏目。学术报告类论文字数控制在 3000 字以内; 病例报告类论文字数控制在 800 字以内。稿件格式为题名、作者姓名、作者单位、邮编、摘要(具体要求见投稿细则)、关键词、正文、参考文献。

本刊对国家级的科研成果或阶段性成果及部级以上课题项目的进展报道实行速审快发。一般稿件 2 个月内有评审结果, 录用后等待发表。请作者自行登录本刊网站(www.zqxdyx.com)查询稿件处理结果, 恕不另行通知。稿件发表后, 赠当期杂志 2 本。

投 稿 细 则

1. 文稿力求文字精练、准确、通顺; 文题简明、醒目, 能反映出文章的主题; 勿用不规范字。请作者仔细校对全文, 并认真复核数据。摘要应与正文内药物剂量、病例数、百分比等数据一致。如有错误, 将降低审稿人和编辑对该文真实性的信任度, 导致退稿。	6. 所有栏目需附关键词 3~5 个, 其中临床报道、学术报告和病例报告只需中文关键词, 其余栏目需中英文关键词齐全。
2. 文题中不使用英文缩略语。摘要中一般也不使用英文缩略语, 如因为该词出现多次而需要使用时, 应于首次出现处先写出中文全称, 然后括号内注明英文缩略语(此处不需写出英文全称)。正文中首次使用英文缩略语时, 也应于首次出现处先写出中文全称, 然后括号内注明英文全称及英文缩略语。此规则对已公知、公用的缩略语除外。	7. 照片、图片(黑白原始照片必须清晰, 大小 5 cm × 7 cm), 须在文章内标明其位置, 并附标题, 显微镜下照片应标明放大倍数, 图背面标明作者姓名、文章编号、图序及照片方向(上、下)。
3. 单位介绍信原件, 注明稿件非一稿多投。采用网上投稿方式时, 请将该介绍信照片插入提交的论文 Word 文稿第一页。	8. 所有栏目参考文献须引用 10 条以上, 以近 5 年文献为主。引用期刊的格式为: 作者. 文题. 刊名, 年, 卷(期): 起止页码.; 引用书籍的格式为: 著者. 书名. 版次. 出版地: 出版社, 年份: 起止页码.; 每条参考文献应列出作者姓名, 如超过 3 名者, 则在 3 名作者后写等。中文格式: 解勤之, 陈方平, 蹇在伏, 等. 红细胞收缩: 血小板无力症的可能代偿机制[J]. 中国医学工程, 1998, 8(11): 3-5。 英文格式: Szeman B, Nagy G. Changes in cognitive function in patient with diabetes mellitus[J]. Orv Hetil, 2012, 153(9): 323-329.
4. 所有栏目投稿的中英文论文题目、作者姓名及作者单位需齐全(每位作者只标注一个主要单位, 其余的可以作者简介方式在首页左下角注明, 标注通信作者的必须留下通信作者本人的电话或电子邮箱, 以便核实)。	9. 综述第一作者须有副高以上职称证明, 并注明综述人、审校人字样(参考文献 35 条以上)。
5. 栏目对中英文摘要的要求: 论著、临床论著、新进展研究中英文摘要齐全, 并按目的、方法、结果、结论四要素书写, 200~500 个字。综述需中英文摘要齐全, 不需按四要素书写。临床报道和学术报告只需中文摘要, 病例报告无需中英文摘要。	10. 凡国家、省部级自然科学基金、博士基金、863 计划及国家重点实验室项目的论文, 请注明基金名称及编号并附相关项目批准文件或任务书复印件, 可优先发表。项目主要负责人为通信作者。采用网上投稿方式时, 请将相关证明材料的照片插入提交的论文 Word 文稿最后一页。