

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

胡蜀红¹⁾ 杨 雁¹⁾ 张建华¹⁾ 张木勋^{1)*} 龚成新^{2,3)}

(¹⁾华中科技大学同济医学院附属同济医院内分泌科, 武汉 430030;

²⁾Department of Neurochemistry, New York State Institute for Basic Research in Developmental Disabilities,
1050 Forest Hill Road, Staten Island, New York, NY 10314, USA;

³⁾华中科技大学同济医学院病理生理系, 武汉 430030)

摘要 Tau 蛋白过度磷酸化是 Alzheimer 病(AD)发病的关键事件. 由于 2 型糖尿病是 AD 的风险因子, 并且胰岛素抵抗是 2 型糖尿病的特征, 检测了胰岛素抵抗大鼠大脑海马 tau 蛋白磷酸化水平, 以及运用胰岛素增敏剂罗格列酮(TZD)后磷酸化的变化, 发现胰岛素抵抗组大鼠海马 tau 蛋白呈过度磷酸化改变, 但运用 TZD 后, tau 蛋白的磷酸化状态有所恢复. 由于糖原合成激酶-3 β (GSK-3 β) 位于胰岛素信号转导途径中, 并且是 tau 蛋白的重要磷酸激酶, 研究检测罗格列酮干预前后 GSK-3 β 活性, 发现均升高. 研究结果表明, 肥胖时胰岛素抵抗导致细胞内胰岛素信号转导途径中, 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; 虽然 TZD 可抑制 tau 蛋白的过度磷酸化, 但可能不是通过下调 GSK-3 β 活性的途径.

关键词 胰岛素抵抗, tau 蛋白, 罗格列酮, 蛋白磷酸化, 糖原合成酶激酶-3 β

学科分类号 R587.1

Tau 蛋白是神经细胞中含量最高的微管相关蛋白, 其正常功能是促进微管蛋白组装成微管, 并维持微管的稳定性, tau 蛋白的过度磷酸化是早发性痴呆(Alzheimer disease, AD)最早出现的病理改变之一^[1]. 近年的研究表明, 脑内的胰岛素水平异常是促使 AD 发生的重要原因^[2], 流行病学资料也显示了以胰岛素抵抗为特征的 2 型糖尿病与 AD 的发生有关联, 但具体的机制并不清楚^[3]. 由于作为胰岛素信号转导途径中组成部分的糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β) 是导致 tau 蛋白磷酸化的重要激酶^[4], 研究异常胰岛素水平对 GSK-3 β 活性以及 tau 蛋白磷酸化程度的影响, 对于从分子水平上解释糖尿病与 AD 的关系具有重要的意义. 本研究运用胰岛素增敏剂罗格列酮(Rosiglitazone, TZD)改善肥胖大鼠的胰岛素抵抗状态, 通过检测海马 tau 蛋白磷酸化及 GSK-3 β 活性的变化, 探讨胰岛素抵抗对 tau 蛋白 AD 样磷酸化的影响.

1 材料及方法

1.1 动物模型

雄性 Wistar 大鼠(华中科技大学同济医学院动

物中心提供), 体重 180~220 g, 10~12 周龄. 将大鼠随机分成 3 组, 对照组(CTL): 给予普通饮食喂养; 胰岛素抵抗组(IR): 高脂高糖高蛋白饮食喂养[热卡百分比为碳水化合物 26%, 蛋白质 15.2%, 脂肪(炼猪油)58.8%]; 罗格列酮组(TZD): 给予高脂高糖高蛋白饮食喂养 3 个月, 然后用罗格列酮片按照每天 3.0 mg/kg 灌胃 4 周(罗格列酮片由格兰素史克公司提供, 批号: 03080005), CTL 及 IR 组同等剂量生理盐水灌胃. 3 个月加 4 周后处死所有本实验动物模型. 实验过程中, 大鼠单笼饲养于恒温(25℃)的清洁级动物房中, 每天光照 12 h, 天黑前投食, 自由饮水, 未经任何降糖药物处理.

1.2 观察指标及方法

1.2.1 一般指标. a. 血糖(plasma glucose): 大鼠处死前由尾静脉采血, 用血糖仪(强生稳豪产品)检测血糖水平. b. 血浆胰岛素(plasma insulin): 处死前心脏取血 1 ml, 离心后取血浆, -20℃ 保存, 放射免疫

* 通讯联系人.

Tel: 027-83662883, E-mail: zhangmuxun@medmail.com.cn

收稿日期: 2006-11-9, 接受日期: 2006-12-28

法一次性检测. 试剂盒购自北京原子能研究所, 测定值批内 $CV < 2.5\%$, 批间 $CV < 3.5\%$. c. 胰岛素抵抗指标以稳态模型的胰岛素抵抗指数 $HOMA-IR = FINS (IU/L) \times FPG (mmol/L) / 22.5$ 表示^[9].

1.2.2 蛋白质印迹分析各组海马内总 tau 蛋白、tau 蛋白上部分位点磷酸化水平. 处死动物, 取出双侧海马. 一侧放入匀浆器内, 加入蛋白质提取液, 冰上匀浆. 蛋白质提取液为 40 mmol/L Tris-HCl, pH 7.0, 1% Triton X-100, 0.2% SDS, 1.0 mmol/L 脱氧胆酸钠, 1.0 mmol/L Na_3VO_4 , 50 mmol/L NaF, 1.0 mmol/L PMSF, 2.0 mg/L 的 aprotinin、leupeptin、pepstatin, 1.0 mmol/L EGTA 及 1.0 mmol/L EDTA(以上试剂购自武汉凌飞科技公

司). 于 4℃ 离心机内 12 000 g 离心 10 min, 取上清即为蛋白质. 取 10 μ l 用 Bradford 法检测蛋白质浓度, 其余储存于 -80℃ 备用. 用前加 2× 样本缓冲液并混匀, 于 100℃ 变性 5 min. 在具 15 道双垂直电泳槽内每孔内加入约 12 μ g 蛋白质, 10% SDS-PAGE 电泳, 结束后全湿转至 NC 膜. 摇床上 5% BSA 封闭 2 h; 杂交一抗(所有抗体如表 1 所示), 4℃ 过夜; PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; 杂交二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗兔、羊抗小鼠及兔抗羊 IgG 购自 PIERCE 试剂公司), 室温摇床上 1 h; PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; DAB 试剂盒显色. 实验重复 3 次, 以 β -actin 作内参照. 运用 BandScanV5.0 软件对免疫反应条带进行定量分析.

Table 1 Primary antibodies employed in this study

Antibody	Type	Specificity	Phosphorylation sites	Reference/Source
pS199	Polyclonal	Phosphorylated tau	Ser199	Biosource, Camerillo, CA
pT212	Polyclonal	Phosphorylated tau	Thr212	Biosource
pS214	Polyclonal	Phosphorylated tau	Ser214	Biosource
pS396	Polyclonal	Phosphorylated tau	Ser396	Biosource
pS422	Polyclonal	Phosphorylated tau	Ser422	Biosource
R134d	Polyclonal	Total tau		Tatebayashi et al.1999
Actin(1~19):	Polyclonal	β -Actin		Santa Cruz, Santa Cruz, CA

1.2.3 GSK-3 β 活性检测. 取另一侧海马组织放入匀浆器, 加入蛋白质提取液, 冰上匀浆. 蛋白质提取液为: 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.0, 10 mmol/L β - 巯基乙醇, 1.0 mmol/L EDTA, 1.0 mmol/L PMSF, 2.0 mg/L 的 aprotinin、leupeptin 及 pepstatin. 于 4℃ 离心机内 12 000 g 离心 10 min, 取上清即为具有活性的蛋白质. 储存于 -80℃ 备用. GSK-3 β 特异性底物肽 Phospho-GS peptide 从 Upstate Biotechnology 购买, γ ^{32}P -ATP 从北京雅慧生物医学工程公司购买. 检测样本内 GSK-3 β 活性步骤如下: a. 测定 γ ^{32}P -ATP 放射活性, 根据 γ ^{32}P -ATP 放射活性和总体积计算 ATP 配制浓度, 将非放射性 ATP 和 γ ^{32}P -ATP 充分混合, 使其在反应体系中的终浓度为 0.2 mmol/L. b. GSK-3 β 活性测定反应体系: 每个 EP 管中加入①GSK-3 β 反应液 2 μ l (成分为: 100 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 50 mmol/L $MgCl_2$, 2.5 mmol/L DTT, 750 mmol/L NaCl 及 5.0 mmol/L BSA), ② Phospho-GS 底物 1 μ l; ③蛋白质样品 5.5 μ l (根据浓度不同加入不同

体积使蛋白质总量相同, 不够的用蛋白质提取液补足体积至 5.5 μ l), ④2 mmol/L 非放射性 ATP 1 μ l, ⑤ γ ^{32}P -ATP 0.5 μ l. 反应体系总体积为 10 μ l. γ ^{32}P -ATP 放射性活度为 2 000/min. c. 振荡混匀后, 30℃ 孵育 15 min. d. 加入 25 μ l 的 300 mmol/L H_3PO_4 反应终止液, 终止反应. e. 各取 15 μ l 反应液滴在磷酸纤维膜上. f. 以 75 mmol/L H_3PO_4 洗涤液充分洗膜 3 次. g. 室温干燥过夜. h. 显影.

1.3 统计学处理

资料用 Graph Pad 生化数据处理软件包 Prism4.0 进行统计处理. 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组均数间比较采用 ANOVA 方差分析.

2 结 果

2.1 各组大鼠实验室资料比较

如表 2 所示, IR 组及 TZD 组大鼠血糖水平与 CTL 组比较无显著差异, IR 组血浆胰岛素水平显著高于 CTL 组, 而 TZD 组与 CTL 组比较无显著差异. 根据 HOMA 公式计算出的胰岛素抵抗指数显

示, IR 组 HOMA-IR 显著高于 CTL 组, 但 TZD 组胰岛素抵抗指数与 CTL 组比较无显著差异. 此结果说明, 用 3 个月的高糖高脂高蛋白饮食造胰岛素抵

抗模型成功, 并且用 TZD 干预 4 周后可以改善外周组织的胰岛素抵抗状态.

Table 2 Design of experimental rats and laboratory data

Groups	Insulin resistant group/IR	Rosiglitazone group/TZD	Control group/CTL
Diet	High sugar, high fat and high protein diet	High sugar, high fat and high protein diet	Normal diet
TZD administered	No	Yes	No
Mass before killed/kg	399.6 ± 11.4*	375.7 ± 5.9*	300.4 ± 21.6
Plasma glucose/mmol·L ⁻¹	8.41 ± 2.45	7.61 ± 1.59	6.20 ± 2.31
Plasma insulin/IU·L ⁻¹	22.57 ± 7.52**	10.34 ± 2.19	9.54 ± 2.10
HOMA-IR	8.98 ± 1.67**	3.72 ± 0.71	2.12 ± 1.01

Results are expressed as $\bar{x} \pm s$ for groups indicated as control (CTL), insulin resistant(IR) and rosiglitazone (TZD) group. Differences *vs* CTL are indicated as * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.2 大鼠海马内总 tau 蛋白和 tau 蛋白磷酸化水平

2.2.1 运用蛋白质印迹定量检测 3 组大鼠海马内总 tau 蛋白水平. 多克隆抗体 R134d 能识别磷酸化和

非磷酸化 tau 蛋白, 因此用于检测海马组织中 tau 蛋白的总量. 如图 1 所示, IR 组及 TZD 组大鼠总 tau 蛋白水平与 CTL 组比较无显著差异.

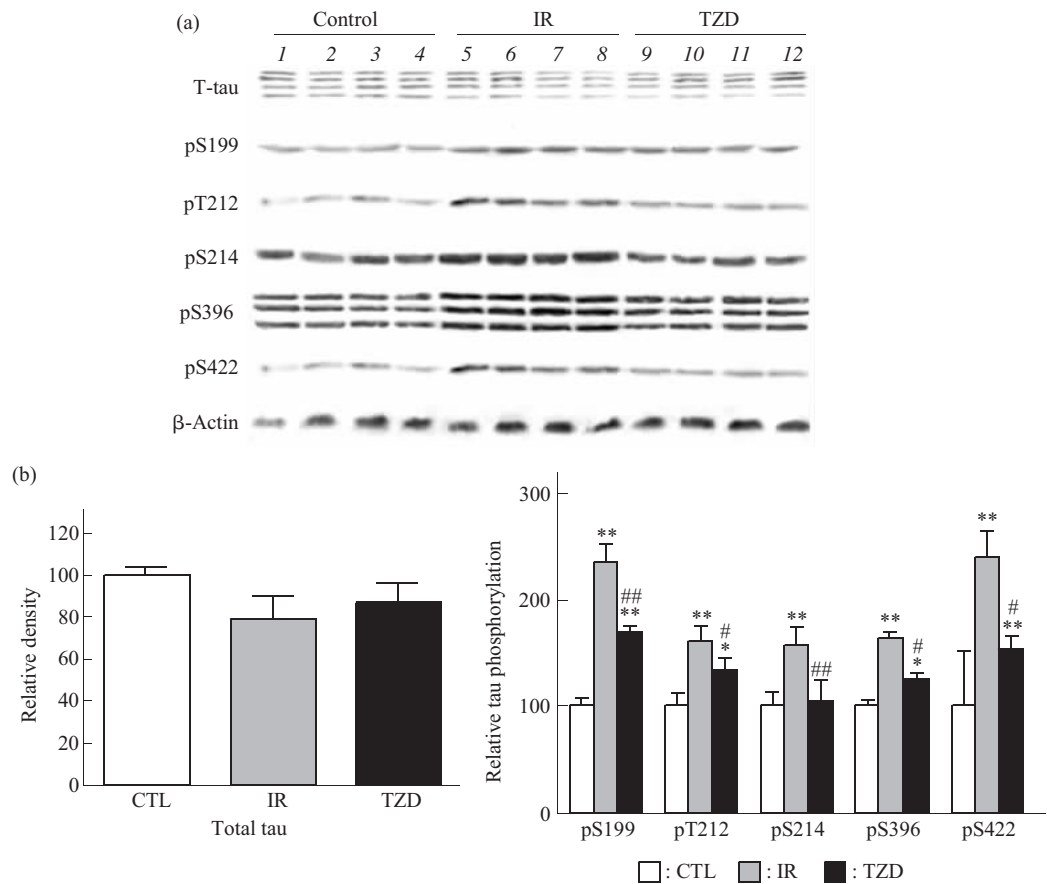


Fig. 1 Western blot analysis of total tau and phosphorylation of tau in rat hippocampi

(a) Crude hippocampal extracts (13 $\mu\text{g}/\text{lane}$) were analyzed by Western blots developed with an antibody to total tau as well as several phosphorylation-dependent and site-specific tau antibodies to detect the phosphorylation levels of tau at the specific sites. Actin blot was included as a loading control. Each lane was from an individual rat. (b) The blots as shown in (a) were quantitated desitometrically and for quantitation of tau phosphorylation level at each site, data had been normalized by the level of total tau. All data are presented as $\bar{x} \pm s$ of the relative immunoreactivities. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ as compared with control group, and # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ as compared with IR group.

2.2.2 运用蛋白质印迹定量检测 3 组大鼠海马内 tau 蛋白上不同位点磷酸化水平. 如图 1 所示, IR 组中 tau 蛋白在位点 Ser199, Thr212, Thr214, Ser396 和 Ser422 上的磷酸化程度是显著高于 CTL 组, TZD 组在位点 Ser199, Thr212, Ser396 和 Ser422 上磷酸化水平与 IR 组比较明显回落, 但仍高于 CTL 组.

2.3 大鼠海马内 GSK-3 β 的活性

由于 tau 分子的 Ser199、Thr212 及 Ser396 都是 GSK-3 β 的磷酸化位点^[8], 推测 GSK-3 β 可能在胰岛素与 tau 蛋白的信号传导中起着重要作用. 因此, 我们运用特异性底物肽及 γ ³²P-ATP 检测不同组细胞内 GSK-3 β 活性. 如图 2 所示, IR 组的 GSK-3 β 活性比 CTL 组高 2 倍以上.

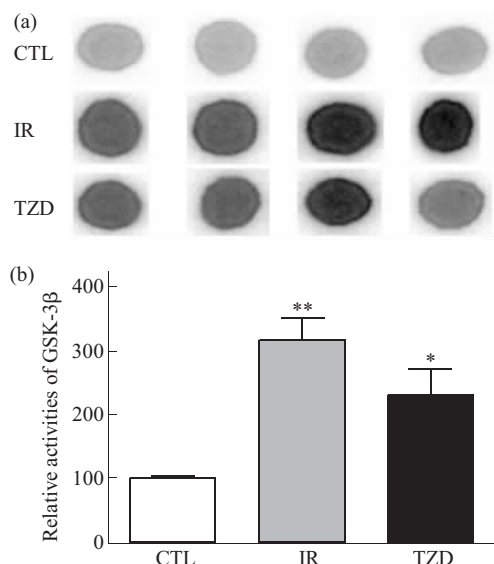


Fig. 2 Activities of GSK-3 β in different groups in rat brain hippocampi

(a) GSK-3 β activity of crude hippocampal extracts from rats was measured by using [γ ³²P] ATP and the specific peptide substrate. Each dot was from an individual rat. (b) The dots as shown in (a) were quantitated densitometrically and for quantitation of the activities of GSK-3 β . All data are presented as $\bar{x} \pm s$ of the relative activities. * P < 0.05 and ** P < 0.01 as compared with control group.

3 讨 论

临床研究显示, 糖尿病已经成为了 AD 的风险因子之一, 提示胰岛素水平与葡萄糖代谢异常对 AD 的发生发展起了重要作用^[9]. 关于胰岛素水平异常导致 tau 蛋白过度磷酸化的途径已有研究, 当外周胰岛素水平下降, 传入神经细胞内的胰岛素信号减少, 下游途径中磷脂酰肌醇-3 激酶(PI-3K)下降,

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, 由于 GSK-3 β 是 tau 蛋白的重要磷酸激酶, 从而 tau 蛋白在部分位点发生磷酸化^[6,7]. 本研究运用胰岛素抵抗大鼠作为模型, 研究了这种状态下海马 tau 蛋白的磷酸化改变. 结果显示, 胰岛素抵抗大鼠海马回中 tau 蛋白呈过度磷酸化状态, 并且 GSK-3 β 的活性升高. 此结果说明, GSK-3 β 活性升高很有可能是胰岛素抵抗引起 tau 蛋白过度磷酸化的重要途径. 本研究选取的是胰岛素抵抗模型, 虽然外周胰岛素水平增高, 但由于胰岛素受体数目或胰岛素与其受体之间的亲和力发生变化, 导致传入细胞内胰岛素信号减少, 从而出现与胰岛素水平减少时一致的 tau 蛋白过度磷酸化现象.

本研究一共选取了 Ser199, Thr212, Ser214, Ser396 及 Ser422 5 个位点的磷酸化水平, 结果在 IR 组这 5 个位点的磷酸化修饰程度都有不同程度的增高. 由于 Ser199, Thr212 及 Ser396 为 GSK-3 β 特异性磷酸化位点^[8], 这几个位点的磷酸化修饰水平增高可能与 GSK-3 β 活性增高有关, 但 Ser214 及 Ser422 在胰岛素抵抗状态下的过度磷酸化状态不应是上述原因所致. Tau 蛋白磷酸化主要有 2 个原因, 一为蛋白激酶的作用增强^[8], 另一个原因是 O-GlcNAc 糖基化修饰水平下降从而同一位点的磷酸化程度增高^[9]. 本研究中 Ser214 及 Ser422 磷酸化修饰程度升高可能与除 GSK-3 β 之外的磷酸激酶活性增高或葡萄糖代谢有关.

TZD 作为胰岛素增敏剂已多有报道, 它是迄今为止作用最强的选择性过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (PPAR- γ)激动剂^[10]. 本研究中运用 TZD 对胰岛素抵抗大鼠的胰岛素抵抗状态进行干预, 4 周后 HOMA-IR 显著下降, 说明 TZD 减轻了外周组织的胰岛素抵抗状态. 然后, 我们检测了 TZD 组大鼠海马 tau 蛋白部分位点上磷酸化水平, 并与用药前进行比较, 发现检测的所有位点在用药组磷酸化水平都较未用药组显著下降, 但检测此组海马 GSK-3 β 活性时发现其活性未显著下降, 说明 TZD 虽然可以降低胰岛素抵抗导致的 tau 蛋白的过度磷酸化, 但可能不是通过胰岛素信号传导途径的恢复、GSK-3 β 活性下降所致. 到底 TZD 通过哪种途径改变海马 tau 蛋白过度磷酸化状态还需要进一步探讨.

本研究表明, 在肥胖大鼠模型中由于胰岛素抵抗、胰岛素信号传导途径受损, 下游 GSK-3 β 活性增高而导致 tau 蛋白发生异常过度磷酸化, 运用

TZD后 tau 蛋白的磷酸化水平下降. 因此, 在以胰岛素抵抗为主要病理生理机制的疾病中, 运用胰岛素增敏剂可能通过降低 tau 的过度磷酸化, 这对于降低 AD 发病具有重要意义.

参 考 文 献

- 1 Iqbal K, Alonso Adel C, Chen S, *et al.* Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta*, 2005, **1739** (2~3):198~210
- 2 Pedersen W A, Flynn E R. Insulin resistance contributes to aberrant stress responses in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Neuro Biol Dis*, 2004, **17** (3): 500~506
- 3 Arvanitakis Z, Wilson R S, Bienias J L, *et al.* Diabetes mellitus and risk of Alzheimer disease and decline in cognitive function. *Arch Neurol*, 2004, **61** (5): 661~666
- 4 Gong C X, Liu F, Grundke-Iqbal I, *et al.* Post-translational modifications of tau protein in Alzheimer's disease. *J Neural Transm*, 2005, **112** (6): 813~838
- 5 Matthews D R, Hosker J P, Rudenski A S, *et al.* Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 1985, **28** (7): 412~419
- 6 Hong M, Lee V M Y. Insulin and insulin-like growth factor-1 regulate tau phosphorylation in cultured human neurons. *J Biol Chem*, 1997, **272** (31): 19547~19553
- 7 Steen E, Terry B M, Rivral 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 Alzheimers Dis*, 2005, **7** (1): 63~80
- 8 Ferrer I, Gomez-Isla T, Puig B, *et al.* Current advances on different kinases involved in tau phosphorylation, and implications in Alzheimer's disease and tauopathies. *Curr Alzheimer Res*, 2005, **2** (1): 3~18
- 9 Cheng X, Gong C X, Liu F, *et al.* Impaired brain glucose metabolism leads to Alzheimer neurofibrillary degeneration through a decrease in Tau O-GlcNAcylation. *J Alzheimer's Dis*, 2006, **9** (1): 1~12
- 10 Hammarstedt A, Andersson C X, Rotter Sopasakis V, *et al.* The effect of PPARgamma ligands on the adipose tissue in insulin resistance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2005, **73**(1): 65~75

Rosiglitazone Ameliorate Alzheimer-like Hyperphosphorylation of tau Protein in The Hippocampus of Rats With Insulin Resistance

HU Shu-Hong¹⁾, YANG Yan¹⁾, ZHANG Jian-Hua¹⁾, ZHANG Mu-Xun^{1)*}, GONG Cheng-Xin^{2,3)}

¹⁾Department of Endocrinology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China;

²⁾Department of Neurochemistry, New York State Institute for Basic Research in Developmental Disabilities,
1050 Forest Hill Road, Staten Island, New York, NY 10314, USA;

³⁾Department of Pathophysiology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract Abnormally hyperphosphorylation of tau plays a critical role in the pathogenesis of Alzheimer disease (AD). Type 2 diabetes whose character is insulin resistance is a known factor of AD. Tau protein were found to be hyperphosphorylated at several AD-related phosphorylation sites (Ser199, Thr212, Ser214, Ser396 and Ser422) in insulin resistant rats. TZD treatment reduced hyperphosphorylation of Ser199, Thr212, Ser396 and Ser422 of tau significantly and of Ser214 of tau to the control level. The activity of GSK-3 β was found to be increased dramatically in the hippocampi before and after TZD treatment. These findings suggest (1) that insulin resistance induced by obesity causes a downregulation of insulin signal transduction and the consequent upregulation of GSK-3 β activity, which leads to hyperphosphorylation of tau protein, and (2) that rosiglitazone can partially reverse insulin resistance induced tau hyperphosphorylation, which may not mediated by inhibition of GSK-3 β activity.

Key words insulin resistance, tau protein, rosiglitazone, protein phosphorylation, glycogen synthase kinase-3 β

*Corresponding author . Tel: 86-27-83662883, E-mail: zhangmuxun@medmail.com.cn

Received: November 9, 2006 Accepted: December 28, 2006