

肥胖及 2 型糖尿病大鼠 Alzheimer 病样 Tau 蛋白过度磷酸化修饰及机制探讨

杨 雁¹⁾ 胡蜀红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, 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 蛋白异常过度磷酸化修饰在阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 发病机理中起非常重要的作用, 而 2 型糖尿病是 AD 的风险因素之一. 采用蛋白质印迹研究 2 型糖尿病及单纯肥胖大鼠脑中海马回 tau 蛋白磷酸化程度, 发现在这两种大鼠模型中海马 tau 蛋白在多个位点上都呈现过度磷酸化状态. 同时, 胰岛素信号传导系统中的关键酶糖原合成激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β) 活性在这两种大鼠模型的海马回中明显增高, 经脑立体定位法向大鼠海马回注射 GSK-3 β 抑制剂氯化锂 (LiCl), 可阻止 2 型糖尿病及肥胖大鼠模型中的 GSK-3 β 激活, 但仅阻止单纯肥胖大鼠海马回 tau 蛋白过度磷酸化. 另外, 海马神经细胞膜上胰岛素受体 β 亚基水平在两种实验模型中显著下降. 研究结果表明, 2 型糖尿病及肥胖可能通过增高胰岛素抵抗, 从而导致 GSK-3 β 激活和 tau 蛋白的过度磷酸化来提高 AD 的发病风险. 2 型糖尿病脑中低下的葡萄糖代谢也可能在 tau 蛋白的过度磷酸化起一定作用.

关键词 胰岛素抵抗, 阿尔茨海默病, Tau 蛋白, 糖原合成酶激酶-3 β , 过度磷酸化

学科分类号 R587.1

2 型糖尿病是一种以胰岛素抵抗为病理基础, 以高血糖、高胰岛素血症为特征的常见的内分泌代谢病. 阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 是一种以进行性痴呆 (记忆减退、认知障碍以及人格改变) 为临床特征, 以大脑皮质和海马区域出现细胞外老年斑 (SP)、细胞内神经原纤维缠结 (NFT) 和营养不良性轴突的改变为病理特征的神经变性疾病^[1]. NFT 的形成主要由于 tau 蛋白的异常磷酸化所致, 老年斑的形成与 β 淀粉样蛋白 (A β) 在细胞外的过度沉淀有关, 其中, tau 蛋白的过度磷酸化是 AD 最早出现的病理改变^[2]. 流行病学资料显示, 2 型糖尿病是 AD 的风险因素之一, 但其机理尚不清楚^[3,4]. 目前研究结果认为, 胰岛素信号系统功能低下时, 会导致下游途径中磷脂酰肌醇-3 激酶 (PI3K) 下降, 从而导致 tau 蛋白磷酸化的主要糖原合成激酶 (GSK)-3 β 活性增高^[5~7].

为了研究糖尿病增高 AD 风险的机理, 本研究选取成年 SD 雄性大鼠, 通过高脂高糖高蛋白饮食 2 个月制胰岛素抵抗模型, 随机选取一半注射链脲佐菌素 (STZ) 造成 2 型糖尿病模型, 并通过脑立体

定位技术给大鼠背侧注射 GSK-3 β 特异性抑制剂氯化锂 (LiCl). 首先观察胰岛素信号系统异常是否会导致 tau 蛋白磷酸化改变, 然后观察 LiCl 注射前后各模型海马 tau 蛋白磷酸化水平的变化, 进一步探讨 2 型糖尿病影响 tau 蛋白磷酸化的可能机制.

1 材料与方法

1.1 动物模型

雄性 SD 大鼠 (华中科技大学同济医学院动物中心提供) 20 只, 体重 180~220 g, 10~12 周龄. 其中 16 只高脂高糖高蛋白饮食, 4 只正常饮食为对照组 (CTL 组). 8 周后, 随机从高脂高糖高蛋白饮食组中取 8 只, 按照 20~25 mg/kg 剂量腹腔一次性注射 STZ (Sigma 公司, 粉剂溶于 0.1 mol/L pH 4.3 柠檬酸钠缓冲液中). 72 h 后尾静脉取血, 血糖仪 (强生稳豪, 强生医疗器材有限公司) 测血

* 通讯联系人.

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

收稿日期: 2005-11-01, 接受日期: 2005-12-29

糖 ≥ 16.7 mmol/L、尿糖持续阳性为造模成功，为 2 型糖尿病模型 (T2DM 组). 余 8 只高脂高糖高蛋白饮食大鼠为肥胖模型 (OB 组) 按照上述方法腹腔注射柠檬酸缓冲液. 1 周后，T2DM 组和 OB 组各随机取 4 只，4%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉，用神经定位注射仪 (华中科技大学) 取平颅头位固定大鼠，

确定双侧前囟后 3.8 mm、中线旁 2.5 mm、颅骨表面下 3.0 mm 为海马背侧部^[8]，用匀速推进器向海马内注射氯化锂 (Sigma 公司，粉剂溶于 PBS 中) 1 μ l，浓度为 20 mmol/L，1.5 min 内完成. 1 天后断颈处死所有老鼠. 实验过程中自由饮水、进食. 未经任何降糖药物处理. 动物分组如表 1 所示.

Table 1 Design of experimental rats and laboratory data ($\bar{x} \pm s$)

Groups	Obese group (OB)	Type 2 diabetic group(T2DM)	Obese+LiCl injection group (OB+LiCl)	Type 2 diabetic +LiCl injection group (T2DM+LiCl)	Control group (CTL)
Number	4	4	4	4	4
Diet	High sugar, high fat and high protein diet	High sugar, high fat and high protein diet	High sugar, high fat and high protein diet	High sugar, high fat and high protein diet	Normal diet
STZ injection	No	Yes	No	Yes	No
LiCl injection	No	No	Yes	Yes	No
Weight before killed/kg	411.2 $\pm$ 21.7 ¹⁾	368.6 $\pm$ 17.0 ²⁾	430.5 $\pm$ 21.4 ¹⁾	382.7 $\pm$ 9.9 ²⁾	300.4 $\pm$ 21.6
Plasma glucose/(mmol·L ⁻¹)	6.99 $\pm$ 0.74	23.11 $\pm$ 4.28 ³⁾	7.61 $\pm$ 1.07	27.62 $\pm$ 3.59 ³⁾	6.20 $\pm$ 2.31
Plasma insulin/(IU·L ⁻¹)	25.17 $\pm$ 0.94 ³⁾	27.60 $\pm$ 1.92 ³⁾	21.32 $\pm$ 4.06 ¹⁾	23.11 $\pm$ 2.11 ³⁾	9.54 $\pm$ 2.10
HOMA-IR	7.96 $\pm$ 1.05 ¹⁾	29.85 $\pm$ 2.77 ³⁾	7.39 $\pm$ 1.89 ¹⁾	26.12 $\pm$ 3.73 ³⁾	2.12 $\pm$ 1.01

Results are expressed as $\bar{x} \pm s$ for groups indicated as control (CTL), type 2 diabetics (T2DM) and obese (OB). Significance was calculated by ANOVA with Bonferroni post-hoc test where differences *vs* control (CTL) group are indicated as ²⁾ $P < 0.05$, ¹⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$.

1.2 观察指标及方法

1.2.1 一般指标. a. 血糖 (plasma glucose). 血糖仪经尾静脉采血测定. 每周复测一次. 糖尿病成模之后，每 2 天复测一次. 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，放射免疫法一次性检测. 药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. 尿糖. 用尿糖试纸对大鼠尿检测. 每周复测一次. 糖尿病成模后，每 2 天复测一次. d. 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)×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 蛋白部分位点磷酸化及海马神经细胞膜上胰岛素受体水平. 处死动物，取出双侧海马分成三部分. 一部分放入匀浆器内，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 Na₃VO₄，50 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，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- 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)，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 2 所示) 4℃过夜，PBST 洗膜 3 次，每次 10 min，杂交二抗 (辣根酶标记的羊抗兔、羊抗鼠及兔抗羊 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. 运用 BandScan V5.0 软件对免疫反应条带进行定量分析.

1.2.3 GSK-3 β 活性检测. 取一部分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 -³²P-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 -³²P-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 综合, 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 ① GSK-3 β 反应液 2 μl (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 μl , ③ 蛋白质样本 2 μg (根据浓度不同加入不同

体积使蛋白质总量相同. 不够的用蛋白提取液补足体积至 5.5 μl), ④ 2 mmol/L 非放射性 ATP 1 μl , ⑤ γ - ^{32}P -ATP 0.5 μl . 反应体系总体积为 10 μl . γ - ^{32}P -ATP 放射性活度为 2 000 Ci/mmol. c. 振荡混匀后, 30 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min. d. 加入 25 μl 的 300 mmol/L H_3PO_4 反应终止液, 终止反应. e. 各取 15 μl 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.

Table 2 Primary antibodies employed in this study

Antibody	Type ¹⁾	Specificity ²⁾	Phosphorylation sites	Reference/Source
pS199	Poly	P-tau	Ser199	Biosource, Camerillo, CA
pT212	Poly	P-tau	Thr212	Biosource
pS214	Poly	P-tau	Ser214	Biosource
PT217	Poly	P-tau	Thr217	Biosource
pS396	Poly	P-tau	Ser396	Biosource
pS422	Poly	P-tau	Ser422	Biosource
R134d	Poly	Total tau		Tatebayashi <i>et al.</i> 1999
H-78	Poly	α Fragment of insulin receptor		Santa Cruz, Santa Cruz, CA
H-70	Poly	β fragment of insulin receptor		Santa Cruz
Actin(I-19):	Poly	β -actin		Santa Cruz

¹⁾ Poly, polyclonal; ²⁾ P-tau, phosphorylated tau.

1.2.4 各组海马神经细胞膜上胰岛素受体数目检测. 取海马组织一部分按照膜蛋白提取步骤提取蛋白质 (Pierce 膜蛋白提取试剂盒, 美国), 得到的蛋白质位于疏水层内. 用透析的方法将位于疏水层中的蛋白质转移至亲水层中. 即将蛋白质放入透析袋中, 浸泡在 A 溶液中 (10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1 mmol/L EDTA, 0.5% Triton X-100 及 0.1% β - 巯基乙醇), 4 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌 12 h, 再将透析袋浸泡至 B 溶液中 (10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1 mmol/L EDTA, 150 mmol/L NaCl 及 0.1% β - 巯基乙醇), 4 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌 12 h, 透析袋中蛋白质即为海马神经细胞膜上蛋白质. 与 2 $\times$ 样本缓冲液混匀, 于 100 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 上样电泳.

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. 以 $P < 0.05$ 为差异有显著意义.

2 结 果

2.1 三组大鼠血浆胰岛素、血糖及胰岛素抵抗程度比较

T2DM 组及 OB 组大鼠胰岛素水平显著高于

CTL 组, T2DM 组血糖水平显著高于 CTL 组, 而 OB 组与后者无显著差异. 根据 HOMA 公式计算出的胰岛素抵抗指数显示, T2DM 及 OB 组 HOMA-IR 显著高于 CTL 组, 说明造模成功 (表 1).

2.2 运用蛋白质印迹检测三组大鼠海马内总 tau 蛋白和 tau 蛋白磷酸化水平

T2DM 组及 OB 组大鼠总 tau 蛋白表达与 CTL 组比较无显著差异, 但图 1 所示, T2DM 及 OB 组中 tau 在位点 Ser199、Thr212、Thr217 及 Ser396 上的磷酸化程度是显著高于 CTL 组, 在 Ser214 及 Ser422 这两个位点上, 3 组 tau 蛋白磷酸化水平比较无显著差异.

2.3 三组大鼠海马细胞内 GSK-3 β 活性比较

由于 tau 分子的 Ser199、Thr212、Thr217 及 Ser396 可被 GSK-3 β 磷酸化^[4], 因此我们运用特异性底物肽及 γ - ^{32}P -ATP 检测细胞内 GSK-3 β 活性. 如图 2 所示, T2DM 组及 OB 组大鼠海马 GSK-3 β 活性显著高于 CTL 组.

2.4 LiCl 注射后 GSK-3 β 活性及海马内总 tau 蛋白和 tau 蛋白磷酸化水平

向大鼠海马内定位注射 GSK-3 β 特异性抑制剂 LiCl 后再次检测 GSK-3 β 活性, 结果发现 LiCl 可阻止 T2DM 组及 OB 组 GSK-3 β 活性的增高 (图 2).

说明在本实验中, LiCl 成功阻断了 GSK-3 β 作用的下游通路. 因此, 我们运用蛋白质印迹检测了 LiCl 注射后 OB 组及 T2DM 组总 tau 水平以及 tau 蛋白部分位点磷酸化水平, 实验结果如图 3 所示, 虽然在 LiCl 注射后的 OB 组中 tau 在 Ser199, Thr212 位点的磷酸化水平有显著下降, 但是在 T2DM 组没有显著改变, 即, tau 蛋白在这 2 个位点上仍呈过度磷酸化改变. 此结果说明在 T2DM 组中除胰岛素传导途径受损, GSK-3 β 活性升高导致 tau 在这

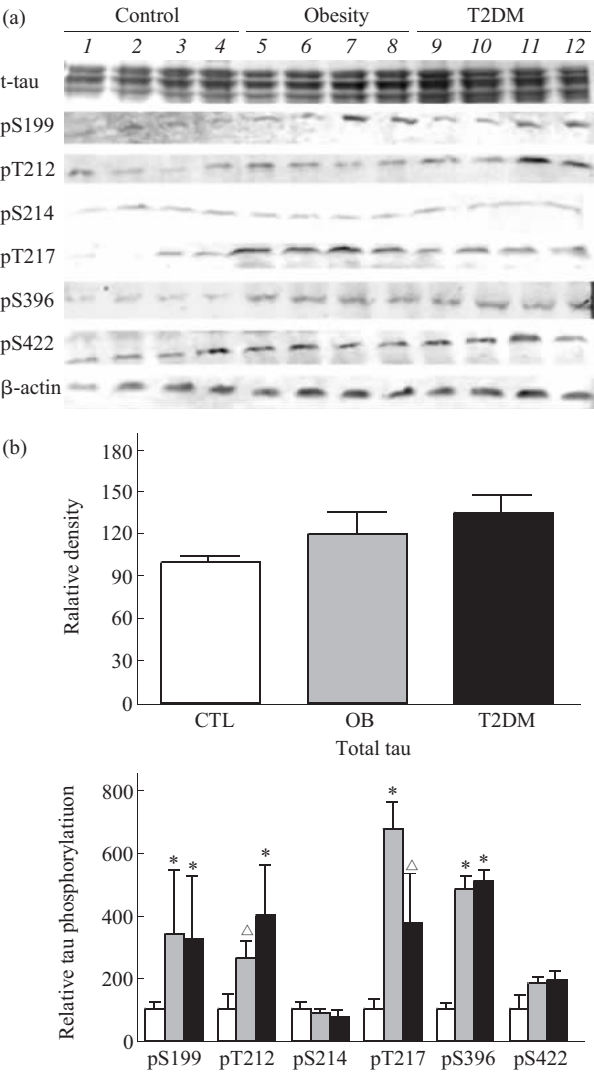


Fig. 1 Western blot analysis of total tau and phosphorylation of tau in rat hippocampi
(a) Crude hippocampal extracts (13 μ g/lane) were analyzed by Western blots developed with an antibody to total tau as well as several phosphorylation-dependent and site-specific tau antibodies to detect the phosphorylation 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 panel 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. $\Delta P < 0.01$, $*P < 0.001$ as compared with control group. $\square$: CTL; $\blacksquare$: OB; $\blacksquare$: T2DM.

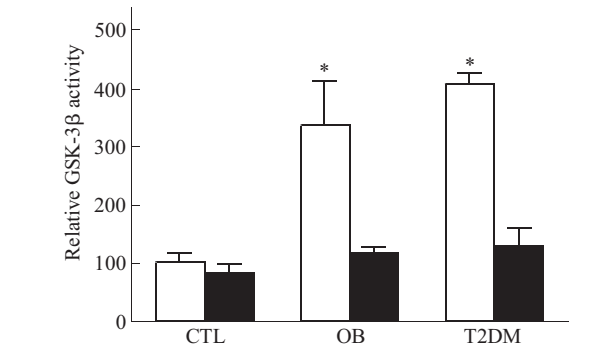


Fig. 2 Activities of GSK-3 β in different groups before and after injection of LiCl into rat brain hippocampi
GSK-3 β activity of crude hippocampal extracts from rats before and after LiCl injection was measured by using γ - 32 P-ATP and the specific peptide substrate. $*P < 0.001$ as compared with control group before injection. $\square$: Before LiCl injection, $\blacksquare$: After LiCl injection.

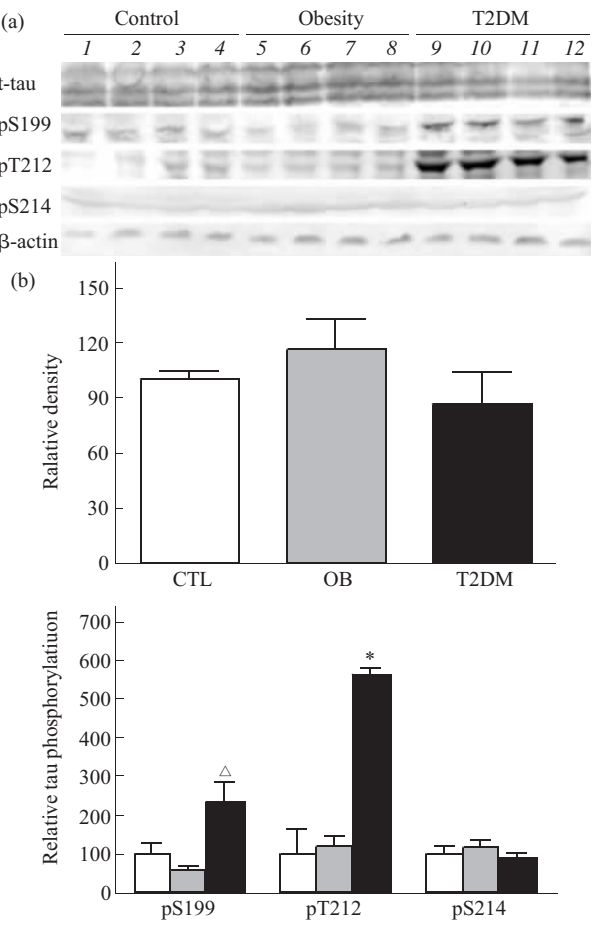


Fig. 3 Western blot analysis of total tau and phosphorylation of tau in rat hippocampi after LiCl injection
(a) Crude hippocampal extracts (13 μ g/lane) were analyzed by Western blots developed with an antibody to total tau and three tau antibodies against its phosphorylation at Ser199, Thr212 and Ser214, respectively. Actin blot was included as a loading control. Each lane was from an individual rat. (b) The blots as shown in panel 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. $\Delta P < 0.01$, $*P < 0.001$ as compared with control group. $\square$: CTL; $\blacksquare$: OB; $\blacksquare$: T2DM.

些位点过度磷酸化以外, 还有其他尚未知的因素导致了 tau 蛋白 Ser199, Thr212 的磷酸化程度增加.

2.5 运用蛋白质印迹检测三组大鼠海马神经细胞膜上胰岛素受体水平

由于胰岛素抵抗可能参与 tau 蛋白上位点过度磷酸化的改变, 我们对胰岛素和神经细胞膜上胰岛素受体的结合进行了研究. 运用蛋白质印迹技术检测 3 组组织提取的细胞膜蛋白内胰岛素受体的表达, 如图 4 所示, T2DM 与 OB 组大鼠海马神经细胞表面胰岛素受体 α 亚基表达无差异, 而 β 亚基的表达较 CTL 组有显著低于下降. 因此, 外周胰岛素水平再高, 由于胰岛素受体功能段即 β 段表达减少, 胰岛素与胰岛素受体结合下降, 传入细胞内信号依然下调, 从而 GSK-3 β 活性升高.

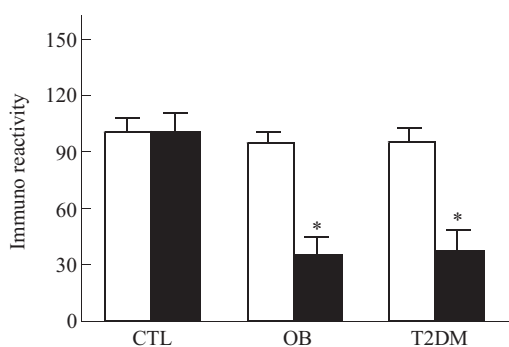


Fig. 4 Levels of insulin receptor in membrane fraction of rat hippocampi

Protein extracted from the membrane fraction of rat hippocampi were analyzed by Western blots developed with antibodies to α subunit (open bar) and β subunit (close bar) of insulin receptor, respectively, and the immunoreactivities quantitated densitometrically. Data are presented as $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.001$ as compared with control group. □: α subunit, ■: β subunit.

3 讨 论

AD 是以进行性痴呆为主要临床症状, 由多种因素引起、有多种病理表现的神经系统退行性疾病. tau 蛋白的过度磷酸化被认为是 AD 形成和发展的关键因素. tau 蛋白是神经细胞主要的微管相关蛋白 (microtubule associated protein, MAP). 正常 tau 的生物学活性主要体现在: a. 与管蛋白的结合形成微管; b. 与已经形成的微管结合以维持其稳定性. 异常磷酸化使 tau 蛋白上述生物学活性丧失, 并且与管蛋白竞争结合正常 tau 蛋白或从已经形成的微管上夺取 tau 蛋白, 导致正常情况下其所有的稳定微管和促进管蛋白聚合成微管作用消失^[10]. tau 蛋白的磷酸化受蛋白激酶和蛋白磷酸酯酶的调节, 许多

蛋白激酶, 如 GSK-3 β 、周期蛋白依赖性激酶 (cyclin activated protein kinases, CDK) 及丝裂原激活蛋白激酶 (mitogen activated protein kinases, MAPK) 都能促使 tau 蛋白磷酸化^[11]. Hong 等^[9]在体外培养人神经细胞观察到, 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 Thr181、Ser199、Ser202、Thr212、Thr217、Ser396 等位点发生磷酸化^[10].

在本研究中, 我们首先证实了在具有胰岛素抵抗特点的肥胖和 2 型糖尿病模型中, tau 蛋白在 Ser199、Thr212、Thr217 及 Ser396 是过度磷酸化的. 在探讨磷酸化形成机理方面, 我们对胰岛素传导途径进行了研究. 胰岛素产生正常的生物学效应的全过程可分为受体前(结合前)、受体和受体后三个密切关联的阶段, 血浆中的胰岛素与细胞膜上胰岛素受体 α 亚单位结合, 形成胰岛素-受体复合物, 引起 β 亚单位 Tyr 激酶的自身磷酸化, 从而激活 Tyr 激酶^[12]. 其后, PI3K 被激活, GSK-3 β 受抑制. 我们检测了海马神经细胞膜上胰岛素受体 α 、 β 亚单位的水平, 结果发现, 在单纯肥胖和 2 型糖尿病动物模型中 α 亚单位表达没有改变, 但 β 亚单位表达显著下降. 同时, 我们检测了受体后胰岛素传导途径中 tau 蛋白激酶 GSK-3 β 活性, 结果发现, 在 T2DM 和 OB 组中, GSK-3 β 的活性都显著升高. 结果说明, 在胰岛素抵抗模型中, 尽管细胞外胰岛素水平高, 但是由于胰岛素受体的改变, 胰岛素信号传导途径发生障碍, PI3K 活性下调, 而 GSK-3 β 增高, 从而出现这两种胰岛素抵抗模型中 tau 蛋白过度磷酸化表达现象. 但胰岛素受体是具有两个 α 亚基两个 β 亚基的四聚体, 在 OB 和 T2DM 模型中为何出现 α 亚基和 β 亚基水平的不同尚不清楚.

2 型糖尿病具有胰岛素抵抗、高胰岛素血症和高血糖的特征. 我们将 LiCl 注入到这组动物模型的海马内用于抑制 GSK-3 β 的活性. 结果显示, 该酶的激活被阻止. 随后, 我们比较 LiCl 注射前后 tau 蛋白在 Ser199 和 Thr212 上的磷酸化程度, 与 OB 组不同的是, LiCl 注射前后 tau 在这两个位点的磷酸化水平并没有发生显著地下降. 由于在本研究中 T2DM 组与 OB 组比较存在糖代谢异常, 因此我们推测, 糖代谢障碍可能参与了 tau 蛋白的过度磷酸化的形成. 文献报道 tau 蛋白被磷酸化修饰之外, 还可以被异常糖基化、异常糖化、异常泛素化及异

常部分水解作用, 并且发现 O-GlcNAc 糖基化修饰与磷酸化修饰在几种胞浆蛋白中同时出现^[11,13]. O-GlcNAc 糖基化修饰是一种单糖 β -N-乙酰氨基葡萄糖通过氧联结途径与丝氨酸/苏氨酸结合形成的氧糖基化蛋白修饰. Liu 等^[13]在对饥饿老鼠模型的研究中发现, 饥饿状态导致的葡萄糖代谢下降可以直接影响到海马神经细胞内的 O-GlcNAc 修饰水平下降, 结果导致 tau 蛋白在许多位点上的磷酸化水平增加. 本研究中我们选取的糖尿病模型具有高胰岛素高糖特征, 可能由于胰岛素传导途径受损, PI3K 下调, 由 PI3K 调控的葡萄糖转运子 3 (GLUT3) 到达细胞膜上的数目减少^[14], 摄入细胞内的糖浓度降低, 导致 O-GlcNAc 修饰水平下降, 从而同一位点上磷酸化修饰程度升高.

综上所述, 在本实验中我们发现了在糖尿病大鼠模型中大脑海马 tau 蛋白是过度磷酸化的, 除了由于神经细胞膜上胰岛素受体减少而导致的信号传导障碍参与了 tau 蛋白异常过度磷酸化的表达之外, 异常的葡萄糖代谢也通过我们尚未弄清的途径影响了 tau 蛋白磷酸化的形成. 这些结果为 2 型糖尿病作为 AD 的风险因素提供了理论依据.

参 考 文 献

- Higuchi M, Iwata N, Saido T C. Understanding molecular mechanisms of proteolysis in Alzheimer's disease: progress toward therapeutic interventions. *Biochim Biophys Acta*, 2005, **1751** (1): 60~67
- 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
- Xu W L, Qiu C X, Wahlin A, *et al.* Diabetes mellitus and the risk of

- dementia in the Kungsholmen project: a 6-years follow-up study. *Neurology*, 2004, **63** (7): 1181~1186
- Arvanitakis Z, Wilson R S, Bienias J L, *et al.* Diabetes mellitus and the risk of Alzheimer disease and decline in cognitive function. *Arch Neurol*, 2004, **61** (5): 661~666
- 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
- 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
- Blass J P, Gibson G E, Hoyer S. The role of the metabolic lesion in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 2002, **4** (3): 225~232
- 包新民, 舒斯云. 大鼠脑立体定向图谱. 北京: 人民卫生出版社, 1991. 47~50
- Bao X M, Shu S Y. *Stereotaxic Atlas of Rat Brain*. Beijing: People Health Press, 1991. 47~50
- 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
- Daly N L, Hoffmann R, Otvos L, *et al.* Role of phosphorylation in the conformation of tau peptides implicated in Alzheimer's disease. *Biochemistry*, 2000, **39** (30): 9039~9046
- 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
- 李秀钧. 胰岛素抵抗综合征. 北京: 人民卫生出版社, 2001. 22~43
- Li X J. *Insulin Resistance Syndrome*. Beijing: People Health Press, 2001. 22~43
- Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, *et al.* O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: A mechanism involved in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101** (29): 10804~10809
- McEwen B S, Reagan L P. Glucose transporter expression in the central nervous system: relationship to synaptic function. *Eur J Pharmacol*, 2004, **490** (1~3): 13~24

Alzheimer-like Hyperphosphorylation of Tau in Brains of Rats With Obesity and Type 2 Diabetes

YANG Yan¹⁾, HU Shu-Hong¹⁾, 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) and type 2 diabetes is a known risk factor of AD. Phosphorylation of tau in type 2 diabetic and obese rats was investigated by Western blots. Tau protein was found to be hyperphosphorylated at several AD-related phosphorylation sites. The activity of glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β), a key component of insulin signal transduction pathway and a known tau kinase, was also found to be increased in the brains of both diabetic and obese rats. Intrahippocampal injection of LiCl blocked activation of GSK-3 β in both groups, but only blocked

hyperphosphorylation of tau in the obese rats. In addition, the β -subunit of the hippocampal membrane insulin receptor was found to be reduced in the brains of obese and type 2 diabetic rats. These findings suggest that obese and type 2 diabetes increase the probability of AD by increased insulin resistance and consequent upregulation of GSK-3 β , which leads to hyperphosphorylation of tau, and that impaired glucose metabolism may also contribute to tau hyperphosphorylation in type 2 diabetes.

Key words insulin resistance, Alzheimer disease, tau protein, glycogen synthase kinase-3 β , hyperphosphorylation

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

Received: November 1, 2005 Accepted: December 29, 2005