

## 罗格列酮对 AD 样小鼠学习记忆减退的影响及机制\*

熊 慧 丁 玲 王景景 郑 晨 宋金芝 潘 彬 邓艳秋\*\*

(天津医科大学基础医学院, 天津 300070)

**摘要** 研究了罗格列酮对链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)脑室内注射的阿尔茨海默病(AD)模型小鼠学习记忆减退的影响及机制。在小鼠脑室内注射 STZ 建立 AD 模型, 治疗组小鼠采用罗格列酮灌胃给药 30 天。Morris 水迷宫实验检测小鼠学习记忆能力, 免疫印迹和免疫荧光检测 Tau 蛋白的磷酸化、神经丝(NFs)蛋白的磷酸化及糖基化、JNK 和 ERK 蛋白的表达, 微管结合实验检测 Tau 蛋白与微管的组装功能, 荧光染料 Fluoro-Jade B 检测小鼠脑内退变神经元。结果显示, 相比对照组, 模型组小鼠平均逃避潜伏期和路径长度明显增加、穿越隐匿平台次数明显减少、Tau 和 NFs 蛋白表达过度磷酸化、NFs 蛋白糖基化减弱, 而用罗格列酮干预的小鼠学习记忆改善并且 Tau 和 NFs 蛋白的磷酸化水平降低、NFs 蛋白糖基化水平增加, Tau 蛋白与微管结合能力改善, 模型组 JNK 的磷酸化高于对照组和治疗组、模型组 ERK1 的磷酸化低于对照组和治疗组、各组在 ERK2 磷酸化无明显差异, 模型组小鼠脑中 FJB 标记的退化神经元明显多于对照组和治疗组。结果说明, 罗格列酮能改善 STZ 脑室内注射引起的小鼠学习记忆减退, 其机制可能与改善胰岛素信号通路、降低 Tau 和 NFs 蛋白的过度磷酸化、减少神经退行性变有关。

**关键词** 罗格列酮, 阿尔茨海默病, 链脲佐菌素, Tau, 神经丝

**学科分类号** R749.1

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2013.00033

阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)是一种严重的神经退行性疾病, 以记忆和认知功能的进行性减退为主要临床特征。目前 AD 的病因尚不明确, 研究发现神经细胞内大量的神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFT)<sup>[1]</sup>是其脑内主要的病理表现之一。NFT 主要成分是异常过度磷酸化的微管相关蛋白 Tau 和细胞骨架蛋白神经丝(neurofilaments, NFs), NFT 的数目与 AD 患者的痴呆程度密切相关, 在 AD 的发病机制中起重要作用。近年研究发现 AD 与 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)在病理表现及相关分子机制方面存在密切的关联<sup>[2]</sup>。T2DM 是 AD 的危险因素之一, 而 AD 患者脑内也出现胰岛素缺乏及胰岛素抵抗, 并伴随葡萄糖摄入和代谢减弱, 中枢胰岛素信号传导通路障碍<sup>[3]</sup>。AD 脑胰岛素信号途径相关的分子如丝裂原激活蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)途径, 表达减少或激活与 Tau 和 NFs 的过度磷酸化聚集密切相关<sup>[4]</sup>。此外, AD 脑内 O-GlcNAc 糖基化水平减少使其同一位点

修饰的磷酸化失调, 也参与调节 Tau 和 NFs 的磷酸化<sup>[5]</sup>。值得注意的是, 临床试验中通过胰岛素鼻内吸入, 使 AD 患者的认知能力提高<sup>[6]</sup>, 提示胰岛素信号转导途径的失调在 AD 发病机制中起重要作用, AD 也被认为是“第 3 型糖尿病”<sup>[7]</sup>。本实验用链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)脑室内注射影响脑内胰岛素信号途径建立经典 AD 模型, 利用 T2DM 治疗药物罗格列酮(rosiglitazone)对 AD 样小鼠进行干预, 增加胰岛素的敏感性, 改善脑内胰岛素信号通路, 并检测 Tau 蛋白病变、NFs 蛋白磷酸化及其糖基化水平、MAPK 信号通路中有丝分裂信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)和细胞应激信号转导途径 Jun-N 端激酶/应激活化蛋白激酶(c-Jun N-terminal kinase/Stress-activated protein kinases, JNK/SAPKs)磷酸化的改

\* 国家自然科学基金资助项目(30973156, 81270422)。

\*\* 通讯联系人。

Tel: 022-83336830, E-mail: dengyanqiu66@gmail.com

收稿日期: 2013-01-18, 接受日期: 2013-04-03

变, 研究罗格列酮对 AD 样小鼠学习记忆能力的影响并探讨其机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

链脲佐菌素购于美国 Sigma 公司; 神经丝 NFs 中链和高链特异性磷酸化抗体 SMI31 购于 Sterberger 公司; 蛋白质特异性 O-糖基化抗体 RL2 购于美国 Abcam 公司; 总神经丝磷酸化和非磷酸化抗体 R61d、识别 Tau 蛋白在 Ser396/404 位点磷酸化的抗体 PHF1 [pSpS396/404] 和 Tau 蛋白磷酸化与非磷酸化抗体 R134d 由美国基础研究所赠送; 识别总 Tau 蛋白的 Tau5 抗体以及识别 Tau 蛋白部分特异性位点的磷酸化抗体 Tau [pSpS199/202]、Tau [pS422]、Tau [pS214]、Tau [pT212]、Tau [pT231] 均购于美国 Invitrogen 公司; Phospho-JNK/SAPKs (Thr183/Tyr185) 和 Total JNK/SAPKs 抗体、Phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) 和 Total ERK1/2 抗体购于 Cell-signal 公司; 荧光染料 Fluoro-Jade B 和 PVDF 膜购于美国 Millipore 公司; Actin 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)、Cy3 标记山羊抗兔 IgG(H+L)、FITC 标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)、蛋白质定量 BCA 试剂盒、超敏 ECL 化学发光试剂盒均购于上海碧云天生物研究所; 罗格列酮片购于山东鲁抗医药股份有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 动物模型建立及治疗。**清洁级雄性昆明小鼠 24 只(购于中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心), 鼠龄 3 个月, 体重 30~40 g, 按随机数表法分为 3 组: 对照组(CON)、模型组(STZ)和治疗组(ROS)。模型组和治疗组侧脑室注射 STZ 3 mg/kg(STZ 用无菌生理盐水配成浓度 240 g/L, 注射剂量约 5  $\mu$ l/只), 对照组注射等量的无菌生理盐水。各组小鼠分别在第 3 天重复脑室内注射。在第 16 天对小鼠进行每天灌胃给药, 罗格列酮按照 2.5 mg/kg 对治疗组小鼠灌胃 30 天, 对照组和模型组给以等量无菌双蒸水灌胃。按标准实验动物饲养, 每周称体重并检测血糖。在第 41 天进行 Morris 水迷宫实验, 第 46 天处死小鼠迅速取脑。

**1.2.2 Morris 水迷宫实验。**在模型建立并用罗格列酮干预后第 41 天, 对小鼠进行 5 天的 Morris 水迷宫实验检测小鼠学习记忆能力。前 4 天定位航行:

将水池分为四个象限, 在目标象限距水面下 1 cm 处放置一个平台, 将小鼠面朝池壁分别由 3 个入水点依次放入水中, 记录小鼠从入水到找到水下的平台时间, 即为逃避潜伏期, 然后让小鼠在平台上停留 30 s。如果小鼠在 90 s 内找不到平台, 逃避潜伏期记为 90 s。第 5 天撤除平台, 进行空间探索实验: 选取同样的 3 个入水点依次将小鼠放入水中, 记录小鼠入水后 90 s 内的游泳轨迹, 其穿越隐匿平台区域的次数以及在目标象限游泳的时间, 即为评价小鼠记忆成绩的指标, 结合逃避潜伏期和路径长度, 评价小鼠的空间学习记忆能力。

**1.2.3 蛋白质免疫印迹。**断头处死小鼠, 在冰上迅速取大脑, 左半脑置于 10%中性甲醛溶液中保存, 作为免疫荧光染色使用; 右半脑放入匀浆器中, 按照脑组织重量与溶液体积比 20%加入预冷的组织裂解液(50 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 2 mmol/L  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 30 mmol/L NaF, 1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L cocktail, 1 mmol/L PMSF, 0.5  $\mu$ mol/L PUGNAc), 在冰浴下制成组织匀浆液, 采用 BCA 法测定匀浆液的蛋白质浓度。根据浓度制成 Western blot 上样缓冲液, 于 100 $^{\circ}\text{C}$  变性 15 min, SDS-PAGE 双垂直电泳, PVDF 膜湿转, 50 g/L 脱脂奶粉或 BSA 封闭 30 min。加入稀释好的一抗 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜, 二抗室温孵育 2 h。ECL 化学发光、显影、定影。Image J 软件分析结果条带。分析总 Tau 蛋白及 Tau 蛋白特异性位点磷酸化水平、NFs 磷酸化及其糖基化水平、JNK 和 ERK 的总蛋白及其磷酸化。

**1.2.4 免疫荧光染色。**各组小鼠脑组织制成石蜡切片, 脱蜡复水, 微波法进行抗原修复。3%双氧水阻断内源性过氧化物酶, 5% BSA 于湿盒内封闭 30 min, 一抗双染。分别用 Tau5 和 Tau[pSpS199/202]、SMI31 和 NFM 孵育 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜。荧光二抗室温孵育 2 h, 荧光保护液封片。共聚焦显微镜观察拍照, 观察各组 Tau 蛋白 Ser199/202 位点的磷酸化和 NFs 磷酸化的改变。Fluoro-Jade B 在抗原修复之后滴加, 经高锰酸钾和二甲苯处理之后烘干, 封片, 拍照, 观察标记的退化神经元情况。

**1.2.5 微管结合实验。**将脑组织重量与溶液体积比为 25%加入预冷的组装缓冲液(50 mmol/L Mes, 0.5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 1 mmol/L EGTA), 在冰浴下制成匀浆液, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、16 000 g 离心 10 min, 取上清于 100 $^{\circ}\text{C}$  热稳定 5 min, 再离心 10 min, 提取 Tau 蛋白上清液, 与微管蛋白在 37 $^{\circ}\text{C}$  结合 60 min, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、50 000 g 离心 25 min, 上清液即含有未与微

管结合的 Tau, 沉淀即为微管结合 Tau 蛋白. 采用免疫印迹技术, 用 R134d 抗体检测结合 Tau(沉淀)和未结合 Tau(上清)的表达量、Tubulin 抗体检测沉淀和上清中微管蛋白的表达量, 分析各组小鼠 Tau 蛋白与微管结合的能力.

### 1.3 统计学分析

实验数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 用 SPSS16.0 统计软件分析数据, 比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 SNK 法, 以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义.

## 2 结 果

### 2.1 小鼠体重和血糖

每周检测小鼠体重和血糖, 结果各组小鼠体重变化均无明显差异, 血糖水平无明显差异且都在正

常值范围之内, 提示在短时间内 STZ 和罗格列酮的干预对小鼠外周的糖代谢无明显影响.

### 2.2 Morris 水迷宫检测小鼠学习记忆能力: 逃避潜伏期、路径长度、在目标象限游泳时间以及穿越隐匿平台次数

**2.2.1 定位航行实验.** 各组小鼠每天的平均逃避潜伏期和路径长度逐渐减少, 说明小鼠通过学习学会寻找平台, 但各组小鼠学习能力不同. STZ 可造成小鼠学习记忆障碍, 即 STZ 组的每天逃避潜伏期和路径长度比对照组明显增加, 而用罗格列酮处理的 ROS 组小鼠, 逃避潜伏期和路径长度相比 STZ 组明显减少, 且与 CON 组比较无显著差异. 以游泳路径长度与逃避潜伏期的比值为游泳速度, 各组无明显差异(图 1).

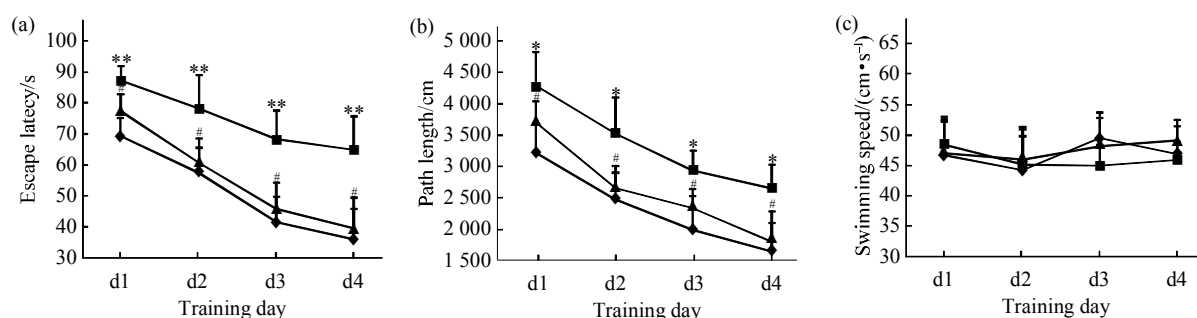


Fig. 1 The result of place navigation test

(a) The STZ group mice spent more time searching for the hidden platform than the control and ROS group. (b) The average path length of consecutive four days in searching for the hidden platform of STZ group mice was also significantly prolonged compared to the control and ROS group. (c) There were no significant changes in the mean swimming speed for each group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. CON group, and # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs. STZ group. ◆—◆: CON; ■—■: STZ; ▲—▲: ROS.

**2.2.2 空间探索实验.** STZ 组在目标象限游泳的时间以及穿越隐匿平台的次数比 CON 组明显减少, STZ 导致小鼠空间记忆能力下降, 而用罗格列酮干

预的 ROS 组小鼠学习记忆有所改善, 在目标象限游泳的时间以及穿越隐匿平台的次数比 STZ 组明显增加(图 2).

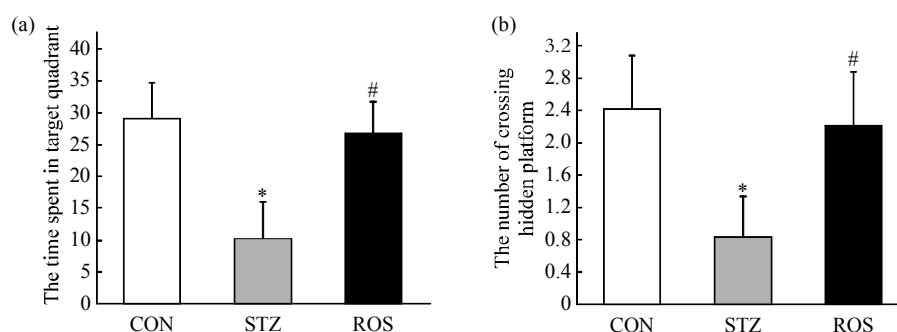


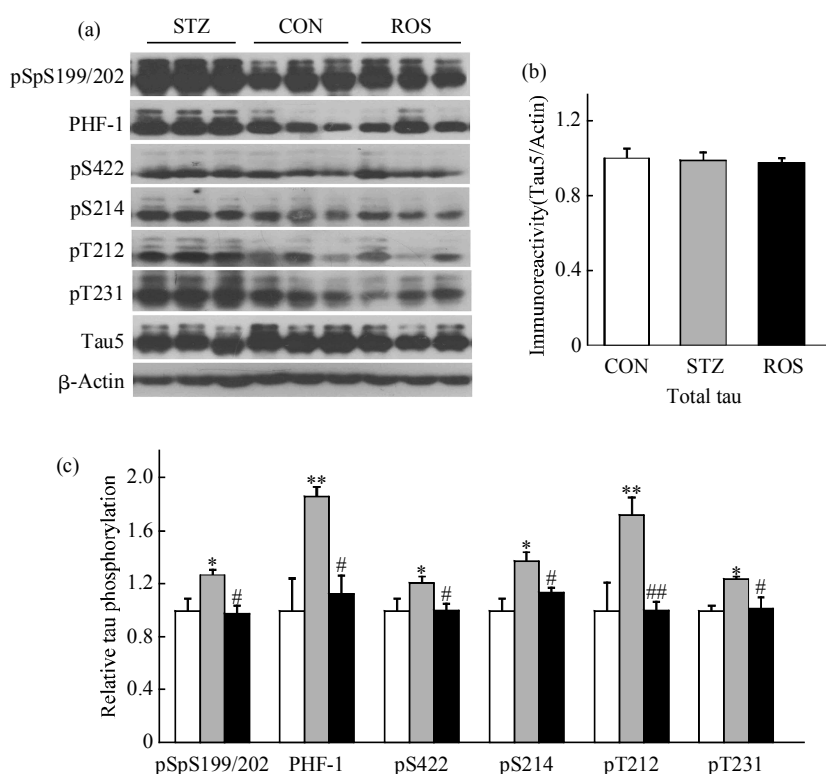
Fig. 2 The result of probe trail test

(a) The percent time spent in target quadrant of the former platform position of STZ model mice was much less than the control group and rosiglitazone-treated mice. (b) The average number of crossing hidden platform of STZ model mice was much less than the control group and rosiglitazone-treated mice. \* $P < 0.05$ , vs. CON group, and # $P < 0.05$ , vs. STZ group.

## 2.3 小鼠脑内总 Tau 蛋白和 Tau 蛋白磷酸化水平

**2.3.1 Western blot 结果.** 采用 Tau5 抗体检测小鼠脑内 Tau 蛋白总量, 结果如图 3a, b 所示, STZ 和 ROS 组与 CON 组比较无显著差异. 如图 3a, c 显示小鼠脑内 Tau 蛋白上不同位点磷酸化水平, 以总

Tau 蛋白量为内参, STZ 组的 Tau 蛋白在 Ser199/202、Ser396/404、Ser422、Ser214、Thr212 和 Thr231 位点的磷酸化作用比 CON 组明显增强; ROS 组与 STZ 组比较, 罗格列酮干预后能够明显降低 Tau 蛋白在这 8 个位点的磷酸化作用(图 3).



**Fig. 3 Western blot analysis of total Tau and phosphorylation of Tau in different sites of mouse brain**

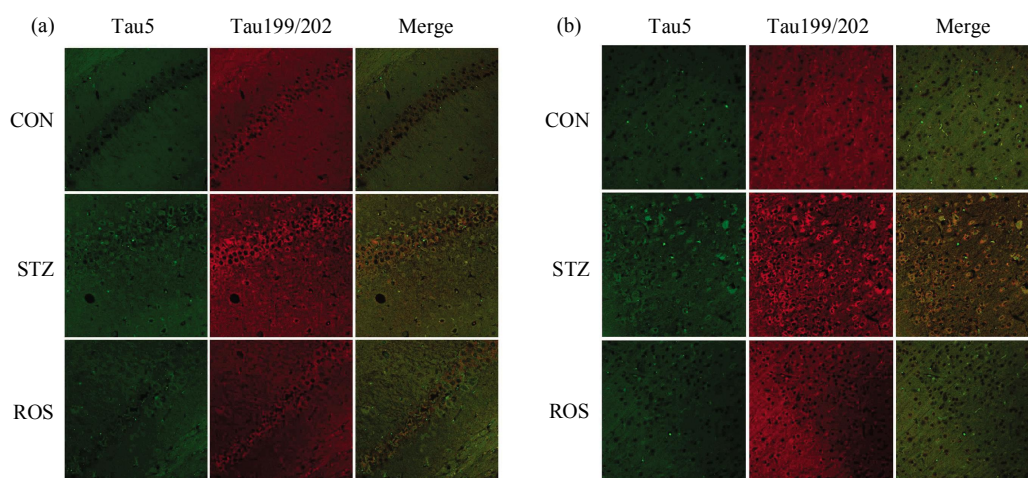
(a) Western blots developed with antibody Tau5 to detect total Tau as well as several phosphorylation-dependent and site-specific Tau antibodies to detect the phosphorylation levels of Tau at the specific sites. Actin blot was included as a loading control. (b) There were no significant changes in the total Tau for each group. (c) The blots as shown in (a) were quantitated and for quantitation of Tau phosphorylation level at each site, data had been normalized by the level of total Tau. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. CON group, and # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs. STZ group.

**2.3.2 免疫荧光染色结果.** 采用 Tau5 和 Tau [pSpS199/202] 抗体荧光双染, 分别检测总 Tau 蛋白和 Tau 蛋白 Ser199/202 位点的磷酸化, 进一步研究小鼠脑组织 Tau 蛋白的病理变化. Tau [pSpS199/202] 抗体标记的海马 CA1 区和皮质区域显示, STZ 模型组的荧光强度明显大于对照组和治疗组, 提示罗格列酮能够减弱 STZ 引起的 Tau 蛋白 Ser199/202 位点的过度磷酸化(图 4).

## 2.4 Tau 蛋白和微管结合

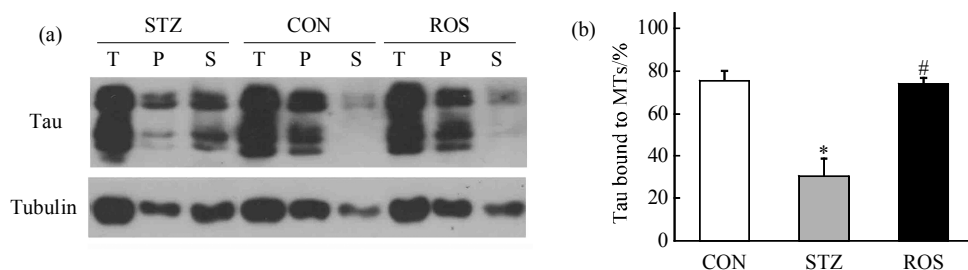
分析微管与 Tau 蛋白的总量(T)、沉淀中微管结合 Tau (P)以及上清中未结合的微管和 Tau(S), 用 R134d 检测 T、P、S 中 Tau 蛋白的含量, 用 Tubulin 抗体检测 T、P、S 中的微管蛋白, 结果如

图 5a 所示, STZ 组微管结合 Tau(沉淀 P)中 Tau 蛋白和微管蛋白较 CON 和 ROS 都较少, 同时 STZ 组上清中未结合的 Tau 蛋白和微管蛋白明显比 CON 组和 ROS 组多, 提示 STZ 组中 Tau 与微管没有充分结合, 而 ROS 组中 Tau 蛋白与微管结合程度相比与 CON 组无明显差异. 三组中微管和 Tau 的总蛋白量无显著差异. 以结合 Tau(P)占总 Tau(T)的百分比评价 Tau 与微管结合的能力, CON 组、STZ 组和 ROS 组的结果如图 5b 所示, 分别为:  $(75.633 \pm 4.690)\%$ 、 $(30.290 \pm 8.987)\%$ 、 $(74.074 \pm 2.881)\%$ , 提示 STZ 对 Tau 和微管蛋白结合的功能具有明显抑制作用, 而用罗格列酮干预之后可明显改善 Tau 蛋白的组装功能(图 5).



**Fig. 4 Immunofluorescence analysis the phosphorylation of Tau in Ser199/202 site of mouse brain**

Triple immunofluorescence staining of mouse brain tissue sections with antibody Tau5, Tau[pSpS199/202] in the CA1 subfield of hippocampus(a) and cortex (b). Both in the CA1 and cortex subfield, the STZ group detected by antibody Tau[pSpS199/202] showed higher fluorescence than CON and ROS group. Scale bar = 20  $\mu$ m. (Immunofluorescence 40 $\times$ )



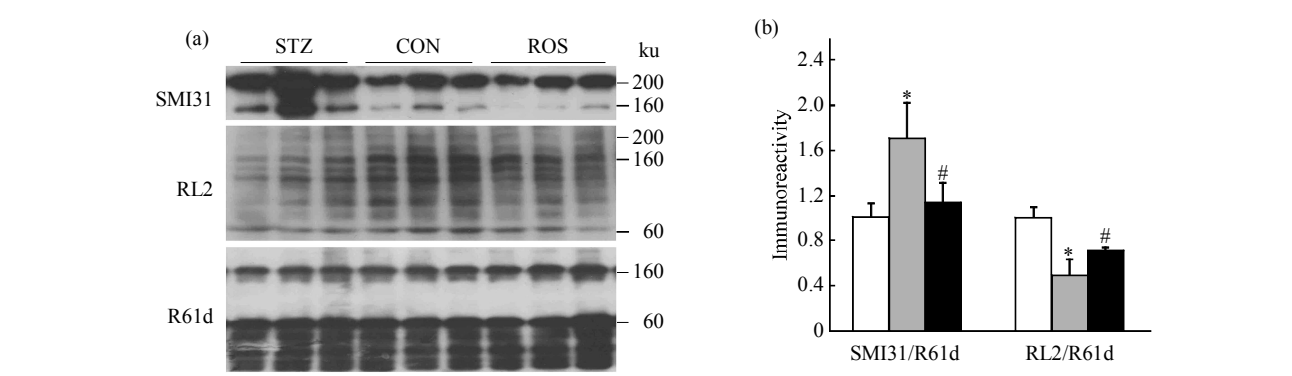
**Fig. 5 Microtubule-binding of Tau**

Tau enriched from mouse brain extracts was incubated with taxol-stabilized microtubules (MTs) at 37 $^{\circ}$ C for 1 h, followed by centrifugation to separate the bound Tau from the unbound Tau. (a) The samples before centrifugation (total, T), the pellets (P) and the supernatants (S) were then analyzed by Western blots developed with antibody R134d toward Tau or antibody Tubulin toward tubulin protein. (b) Tau bands in total, pellets and supernatants were then quantified, and the percentages of Tau in the pellet contrast in the total were calculated in three groups. The STZ group showed lower percentages of bound Tau than CON and ROS group, and there were no significant difference between ROS and CON group. \* $P < 0.05$ , vs. CON group, and # $P < 0.05$ , vs. STZ group.

## 2.5 细胞骨架蛋白神经丝 NFs 的磷酸化和糖基化表达水平

**2.5.1 Western blot 结果.** 采用 SMI31 检测小鼠脑组织神经丝蛋白 NF-H 和 NF-M 磷酸化水平, RL2 检测神经丝的 O-GlcNAc 糖基化水平, 以 R61d 检测总 NFs 作为内参. 结果 STZ 组的神经丝磷酸化

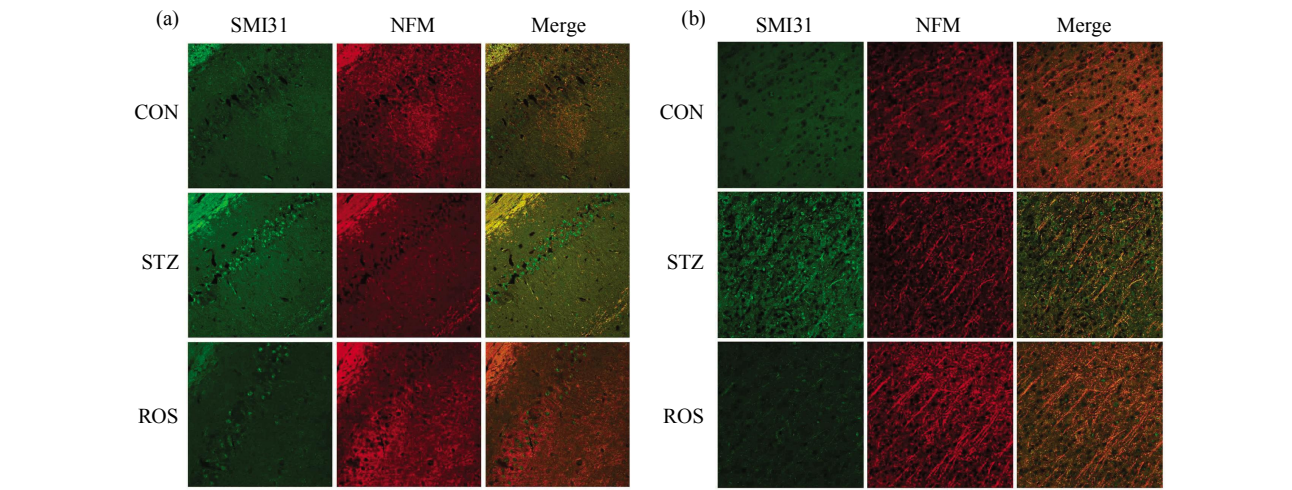
表达增强、相应分子质量的糖基化减弱, 提示模型组小鼠脑内出现 NFs 过度磷酸化的 AD 样病变, 而 ROS 组相比 STZ 组, 其神经丝磷酸化降低且糖基化增强, 同时与 CON 组比较无明显差异, 提示罗格列酮能够减弱由 STZ 诱导的 NFs 过度磷酸化, 可能与改善神经丝的糖基化有关(图 6).



**Fig. 6 Western blot analysis of the phosphorylation and glycosylation of NFs in mouse brain**  
(a) Western blots developed with antibody SMI31 to detect phosphorylation of NF-H and NF-M as well as antibody RL2 to detect the glycosylation levels. R61d blot was included as a loading control. (b) The blots as shown in (a) were quantitated and for quantitation of NFs phosphorylation and glycosylation level at each site, data had been normalized by the level of total NFs. \* $P < 0.05$ , *vs.* CON group, and # $P < 0.05$ , *vs.* STZ group. □: CON; ▒: STZ; ■: ROS.

**2.5.2 免疫荧光结果.** 为进一步研究脑室内注射 STZ 后小鼠脑内神经丝 NFs 过度磷酸化的病理变化以及罗格列酮干预后对其影响, 采用 SMI31 和 NFM 荧光双染检测神经丝的磷酸化, 结果 SMI31

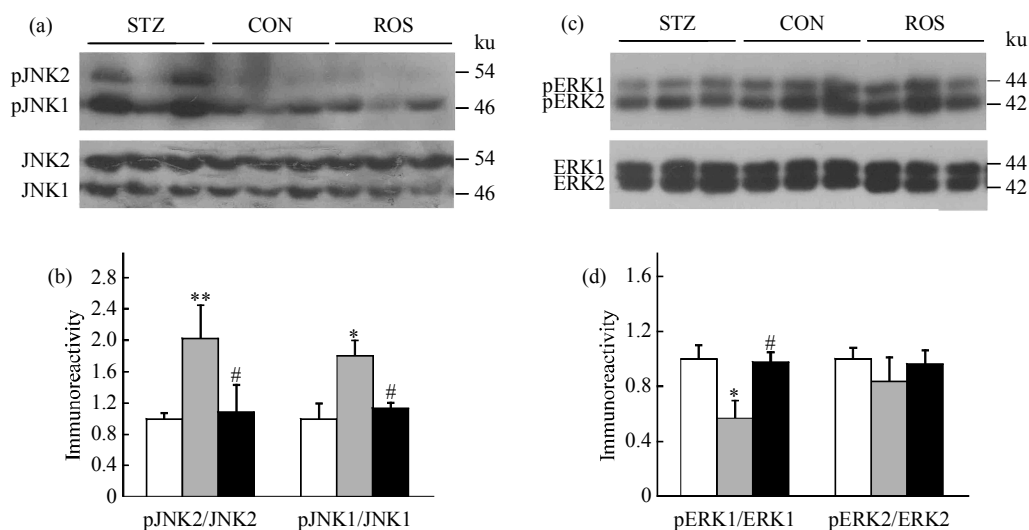
标记的小鼠海马 CA1 区和皮质区域显示 STZ 组荧光强度明显大于 CON 组和 ROS 组, 提示罗格列酮对 STZ 引起的小鼠脑内 NFs 过度磷酸化具有明显改善作用(图 7).



**Fig. 7 Immunofluorescence analysis the phosphorylation of NFs in mouse brain**  
Triple immunofluorescence staining of mouse brain tissue sections with antibody SMI31, NFM in the CA1 subfield of hippocampus (a) and cortex (b). Both in the CA1 and cortex subfield, the STZ group detected by antibody SMI31 showed higher fluorescence than CON and ROS group. Scale bar=20 μm. (Immunofluorescence 40×)

**2.6 Western blot 检测 JNK 和 ERK 总蛋白及磷酸化**  
**2.6.1 JNK 及其磷酸化.** 以 JNK/SAPKs 总蛋白为内参, 比较各组小鼠脑内 JNK/SAPKs(Thr183/Tyr185)位点的磷酸化(pJNK2:54 ku, pJNK1:46 ku)

水平, 结果各组小鼠 JNK 总蛋白无明显差异, STZ 组 JNK2 和 JNK1 的磷酸化表达比 CON 和 ROS 组明显增加, ROS 组相比 CON 组无明显差异, 即 STZ 组 JNK 磷酸化明显增加, 罗格列酮的干预可降低由 STZ 导致的 JNK 的过度磷酸化水平(图 8a,b).



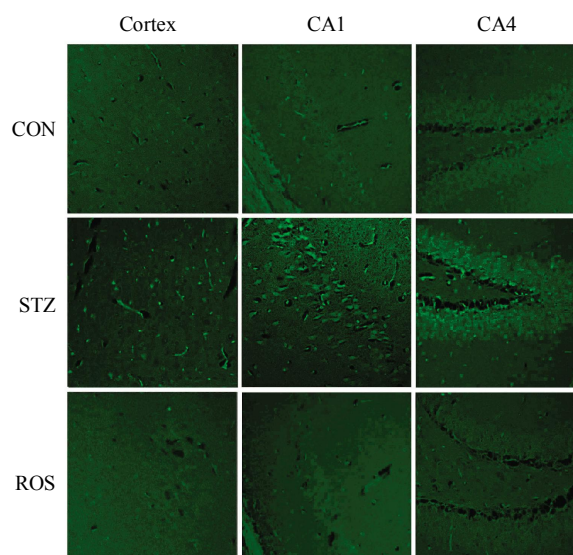
**Fig. 8 Western blot analysis of the total protein and phosphorylation of JNK and ERK in mouse brain**

(a) Western blots developed with antibody recognized phospho-JNK to detect JNK phosphorylation levels as well as antibody JNK to detect the total JNK protein. (b) The blots as shown in (a) were quantitated and data had been normalized by the level of total JNK. (c) Western blots developed with antibody Phospho-ERK1/2 to detect ERK1/2 phosphorylation levels as well as antibody ERK1/2 to detect the total ERK1/2 protein. (d) The blots as shown in (c) were quantitated and data had been normalized by the level of total ERK1/2. \* $P < 0.05$ , vs. CON group, and # $P < 0.05$ , vs. STZ group. □: CON; ■: STZ; ▨: ROS.

**2.6.2 ERK 及其磷酸化.** 以 ERK1/2 总蛋白为内参, 比较各组小鼠脑内 ERK1/2(Thr202/Tyr204)位点的磷酸化(pERK1: 44 ku, pERK2: 42 ku). 结果各组小鼠 ERK 总蛋白无明显差异, STZ 组 ERK1 磷酸化表达比 CON 和 ROS 组明显降低, 用罗格列酮处理的 ROS 组与 CON 组相比无明显差异, STZ 组小鼠 ERK2 磷酸化水平比 CON 组略有降低, 但各组差异无统计学意义. 提示 STZ 可降低小鼠胰岛素信号通路中 ERK1 分子的磷酸化水平, 用罗格列酮干预可改善 STZ 导致的 ERK1 分子磷酸化失调, 但两种药物对 ERK2 的磷酸化影响无明显改变(图 8c, d).

## 2.7 Fluoro-Jade B 标记退化神经元

用荧光染料 Fluoro-Jade B 特异性标记退化的神经元<sup>[9]</sup>, 研究 STZ 小鼠脑内神经退化性变以及罗格列酮的干预作用. 观察小鼠脑组织皮质区、海马 CA1 区和 CA4 区的荧光强度. 结果 STZ 组的 FJB 标记的阳性细胞数明显多于 CON 组和 ROS 组, CON 和 ROS 组无明显阳性细胞, 提示小鼠 STZ 脑室注射能够明显引起神经元退化, 而罗格列酮干预能够减少 STZ 小鼠脑内退化的神经元数量(图 9).



**Fig. 9 Fluoro-Jade B staining of the degenerative nerves in mouse brain**

Photomicrographs showed the FJB-positive degenerative cells in the cortex, CA1 and CA4 subfield of hippocampus. The STZ group mice showed a larger number of FJB-positive cells than the other two groups, while in CON and ROS group, only few FJB-positive cells were observed. Scale bar = 20  $\mu\text{m}$ . (Immunofluorescence 40 $\times$ )

### 3 讨 论

本实验首先利用链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)给小鼠脑室内注射建立 AD 模型。STZ 是一种葡萄糖胺-亚硝基脲复合物,在机体外周破坏胰岛细胞导致糖尿病,在中枢可以阻断胰岛素受体自身磷酸化、持久影响脑内葡萄糖转运蛋白的功能使葡萄糖摄入和代谢障碍<sup>[9]</sup>。STZ 还可干扰内源性酪氨酸激酶活性而导致胰岛素信号转导通路障碍,诱导 Tau 蛋白过度磷酸化<sup>[10]</sup>,因而此模型可模拟 AD 的进行性学习记忆减退、认知功能障碍及脑能量代谢紊乱,是联系脑内胰岛素信号损伤和 AD 的良好模型<sup>[11]</sup>。本实验采用 STZ 脑室内注射干预小鼠脑内胰岛素信号通路,小鼠学习记忆能力明显减退、Tau 和 NFs 蛋白过度磷酸化、MAPK 通路磷酸化异常,并出现神经元退化等 AD 病理特征,成功建立了 AD 散发动物模型,与我们先前文献报告和研究数据相符<sup>[12]</sup>。

Tau 蛋白是一种神经元特有的微管相关磷酸化蛋白,过度磷酸化的 Tau 蛋白聚积在细胞胞体和轴突,导致轴突转运障碍影响神经元的形态和功能,最终导致神经细胞退行性变性<sup>[13]</sup>。神经丝(neurofilament, NF)是神经细胞内一种重要的骨架蛋白,主要由轻链(68 ku, neurofilament light, NFL)、中链(160 ku, neurofilament medium, NFM)和高分子量重链(200 ku, neurofilament heavy, NFH)三种亚基聚合而成,对维持细胞骨架、稳定细胞形态和轴突转运均有十分重要意义<sup>[14]</sup>。AD 脑中 Tau 蛋白异常过度磷酸化的 Tau 和 NFs 蛋白聚积在细胞胞体和轴突,是 AD 早期的病理改变,在 AD 的发病机制中起重要作用。然而 Tau 和 NFs 异常过度磷酸化的机制尚不明确,大量研究表明其磷酸化表达可能与脑内糖代谢减弱及胰岛素信号异常密切相关<sup>[3,5]</sup>。鉴于 T2DM 与 AD 的相关性和 AD 脑内胰岛素信号异常的表现,利用 T2DM 治疗药物如胰岛素增敏剂来干预 AD 脑内异常的胰岛素信号通路,从而减少 Tau 和 NFs 的过度磷酸化改善 AD 样病变,成为近年对 AD 发病机制和治疗药物研究的热点。

本实验所用的胰岛素增敏剂罗格列酮,是过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR $\gamma$ )激动剂,能够增加胰岛素的敏感性并改善脑内胰岛素抵抗,并已有文献报道罗格列酮能明显减少 APP 转基因小鼠脑内沉积的  $\beta$  淀粉样( $\beta$ -amyloid, A $\beta$ )斑块,抑制 A $\beta$

对神经细胞的毒性损伤及炎症反应,减少海马 Tau 蛋白的磷酸化,改善神经元退行性变<sup>[15]</sup>。此外,罗格列酮激活 PPAR $\gamma$ ,能够促进线粒体的生物合成从而促进脑内能量代谢,防止缺糖诱导的神经元细胞缺失<sup>[16]</sup>。PPAR $\gamma$  激动剂还能够维持海马神经细胞内 Ca<sup>2+</sup> 稳态,参与炎症和代谢、细胞生长和分化,改善神经元功能和活性从而减少神经细胞的凋亡<sup>[17]</sup>。本实验用罗格列酮干预 AD 样小鼠,发现罗格列酮可明显提高 AD 小鼠的学习记忆能力、降低脑内 Tau 蛋白的异常过度磷酸化,并保护 AD 小鼠神经元减少神经退行性变。文献报道运用胰岛素增敏剂罗格列酮提高了 AD 小鼠的学习记忆能力<sup>[18]</sup>。这些结果提示罗格列酮能够提高认知能力,对改善 AD 的病变具有重要作用,其机制可能与提高 AD 脑内的糖代谢和改善脑胰岛素信号密切相关。

一方面 Tau 和 NFs 除磷酸化修饰以外,还存在 O-GlcNAc 糖基化修饰,由于糖基化与磷酸化修饰位点是同一蛋白质的相同或相近丝氨酸和苏氨酸羟基,因此磷酸化和 O-GlcNAc 糖基化可能存在着竞争性抑制,蛋白质的 O-GlcNAc 糖基化受葡萄糖代谢的调节,脑内减弱的糖代谢可能引起 O-GlcNAc 糖基化水平减少,使其同一位点修饰的蛋白磷酸化失调<sup>[5,19]</sup>。本实验研究 NFs 的磷酸化和糖基化水平,结果 STZ 模型组 NFs 磷酸化程度增高同时 O-GlcNAc 糖基化下降,而用罗格列酮处理后可明显降低 NFs 的磷酸化、增加相应分子质量的 O-GlcNAc 糖基化水平。提示罗格列酮增加脑内的糖代谢对减弱 Tau 和 NFs 的过度磷酸化以及神经系统的退行性变具有重要影响。

另一方面,脑内葡萄糖摄取和代谢主要通过胰岛素信号转导途径的分子调节,胰岛素信号通路异常不仅导致脑内糖代谢障碍,也会引起相关激酶的活性改变,可能影响 Tau 和 NFs 蛋白的磷酸化及其功能,进而导致神经退行性变。胰岛素信号转导通路是一系列由酪氨酸激酶催化的自我磷酸化过程的集合,广泛存在于哺乳动物中,主要有两种信号通路:磷脂酰肌醇-3 蛋白激酶(PI-3K)和 MAPK,这两条通路都与 Tau 蛋白的磷酸化密切相关。本实验研究的 JNK 和 Erk1/2 都属于 MAPK 家族信号分子,直接或间接参与诱导 tau 和 NFs 的过度磷酸化聚集。酸位点磷酸化作用的关键激酶之一——JNK 抑制剂可减低 Tau 蛋白 Ser202、Ser205 和 Ser422 位点的磷酸化<sup>[20]</sup>。JNK 是调节 Tau 蛋白丝氨酸和苏氨酸磷酸化的重要激酶。已有研究表明, Tg2576

转基因小鼠脑中 JNK 的磷酸化水平增加, 并伴有 Tau 蛋白过度磷酸化<sup>[21]</sup>。此外, ERK 也参与 Tau 和 NFs 蛋白的磷酸化, 主要与 A $\beta$ 、氧化应激、钙蛋白酶以及蛋白磷酸酯酶 2A 等有关<sup>[22-24]</sup>。研究发现, 通过增加 ERK 的磷酸化能够调节糖原合成激酶 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) 通路, 从而降低 Tau 蛋白的磷酸化水平<sup>[25]</sup>。JNK 和 ERK 均参与调节 Tau 蛋白的多个磷酸化位点, 如 Ser202、Ser214、Ser396、Ser422、Thr212 等位点<sup>[26]</sup>。Schechter 等<sup>[27]</sup>研究胰岛素基因敲除小鼠, 证明胰岛素缺失可导致 ERK2 磷酸化减弱、激活脑内 JNK 磷酸化并诱导 Tau 蛋白出现过磷酸化, 即 JNK 和 ERK 在胰岛素信号通路中表现异常并与 Tau 蛋白的磷酸化密切相关。此外, 研究证实罗格列酮可通过增强 PPAR $\gamma$  而调节 MAPK 信号通路并改善 Tg2576 AD 小鼠的认知功能<sup>[4]</sup>。结合本实验结果, 通过 STZ 以及罗格列酮的干预, 研究其对胰岛素信号 MAPK 通路中的 JNK 和 ERK 分子磷酸化的影响, 发现模型组小鼠脑内 JNK 磷酸化增强、Erk1 磷酸化减弱, 而用罗格列酮干预后的治疗组, JNK、Erk1 的磷酸化作用都恢复到与对照组相近的水平。我们在研究中发现, 应用罗格列酮减少了 Ser199/202、Ser396/404、Ser214、Ser422、Thr212 和 Thr231 这 8 个 Tau 蛋白位点的磷酸化, 同时改善了 Tau 与微管蛋白的结合能力。提示改善脑内的 JNK、ERK 等胰岛素信号对于改善 Tau 蛋白的磷酸化及功能可能有重要关系: 胰岛素信号异常引起 ERK 磷酸化减弱、JNK 磷酸化增加、脑内糖代谢减弱并伴有 Tau 蛋白的过度磷酸化, 进而影响 Tau 蛋白与微管的结合功能, 小鼠的学习记忆能力减退并发生神经退行性变; 用罗格列酮干预后可改善胰岛素信号通路和脑内糖基化水平, 减弱 Tau 蛋白的过度磷酸化以及改善 Tau 蛋白的组装功能, 并明显提高小鼠的学习记忆能力, 改善脑组织神经退行性变。

我们在研究中发现, 应用罗格列酮明显减少小鼠脑组织的 Tau 和 NFs 的过度磷酸化, 并增加 NFs 的糖基化以及改善 JNK 和 ERK 磷酸化水平。提示应用罗格列酮可能通过改善胰岛素信号通路, 增加脑内糖代谢以及调节相关激酶的活性, 改善小鼠的学习记忆减退和脑组织的神经退行性变。因此, 胰岛素增敏剂可能通过胰岛素信号通路以及脑内糖代谢等方面影响 AD 的发生和发展, 对 AD 的预防和治疗药物研究有重要意义。

## 参 考 文 献

- [1] Umeda Y, Taniguchi S, Arima K, *et al.* Alterations in human tau transcripts correlate with those of neurofilament in sporadic tauopathies. *Neurosci Lett*, 2004, **359**(3): 151-154
- [2] Duarte A I, Candeias E, Correia S C, *et al.* Crosstalk between diabetes and brain: Glucagon-like peptide-1 mimetics as a promising therapy against neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta*, 2013, **1832**(4): 527-541
- [3] Candeias E, Duarte A I, Carvalho C, *et al.* The impairment of insulin signaling in Alzheimer's disease. *IUBMB Life*, 2012, **64**(12): 951-957
- [4] Denner L A, Rodriguez-Rivera J, Haidacher S J, *et al.* Cognitive enhancement with rosiglitazone links the hippocampal PPAR $\gamma$  and ERK MAPK signaling pathways. *J Neurosci*, 2012, **32** (47): 16725-16735a
- [5] Deng Y, Li B, Liu F, *et al.* Regulation between O-GlcNAcylation and phosphorylation of neurofilament-M and their dysregulation in Alzheimer disease. *FASEB J*, 2008, **22**(1): 138-145
- [6] Craft S, Baker L D, Montine T J, *et al.* Intranasal insulin therapy for Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment: a pilot clinical trial. *Arch Neurol*, 2012, **69**(1): 29-38
- [7] de la Monte S M, Wands J R. Alzheimer's disease is type 3 diabetes-evidence reviewed. *J Diabetes Sci Technol*, 2008, **2**(6): 1101-1113
- [8] Damjanac M, Rioux Bilan A, Barrier L, *et al.* Fluoro-Jade B staining as useful tool to identify activated microglia and astrocytes in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease. *Brain Res*, 2007, **1128**(1): 40-49
- [9] Labak M, Foniok T, Kirk D, *et al.* Metabolic changes in rat brain following intracerebroventricular injections of streptozotocin: a model of sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neurochir Suppl*, 2010, **106**: 177-181
- [10] Shonesy B C, Thiruchelvam K, Parameshwaran K, *et al.* Central insulin resistance and synaptic dysfunction in intracerebroventricular-streptozotocin injected rodents. *Neurobiol Aging*, 2011, **33** (2): 435-448
- [11] Chen Y, Liang Z, Blanchard J, *et al.* A non-transgenic mouse Model (icv-STZ mouse) of Alzheimer's disease: similarities to and differences from the transgenic model (3xTg-AD mouse). *Mol Neurobiol*, 2013, **47**(2): 711-725
- [12] 崔冉亮, 戎 凯, 邓艳秋, 等. 链脲佐菌素脑室内注射对小鼠学习记忆功能的影响及其机制. *山东医药*, 2011, **9**(51): 1-3
- [13] 王建枝. Tau 蛋白在老年性痴呆神经细胞退行性变性中的作用. *神经损伤与功能重建*, 2006, **1** (1): 1-3
- [14] 崔冉亮, 戎 凯, 邓艳秋, 等. 神经丝蛋白质糖基化与磷酸化的相互调节和神经退行性疾病. *生命的化学*, 2009, **29**(6): 812-816

- Cui R L, Rong K, Deng Y Q, *et al.* Chemistry of Life, 2009, **29**(6): 812-816
- [15] 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. Neuropsychopharmacology, 2010, **35**(7): 1593-1604
- [16] Miglio G, Rosa A C, Rattazzi L, *et al.* PPARgamma stimulation promotes mitochondrial biogenesis and prevents glucose deprivation-induced neuronal cell loss. Neurochem Int, 2009, **55**(7): 496-504
- [17] Pancani T, Phelps J T, Searcy J L, *et al.* Distinct modulation of voltage-gated and ligand-gated  $\text{Ca}^{2+}$  currents by PPAR-gamma agonists in cultured hippocampal neurons. J Neurochem, 2009, **109**(6): 1800-1811
- [18] Araki A. Dementia and insulin resistance in patients with diabetes mellitus. Nihon Rinsho, 2010, **68**(3): 569-574
- [19] Love D C, Hanover J A. The hexosamine signaling pathway: deciphering the "O-GlcNAc code". Sci STKE, 2005, **2005** (312): re13
- [20] Ploia C, Antoniou X, Sclip A, *et al.* JNK plays a key role in tau hyperphosphorylation in Alzheimer's disease models. J Alzheimers Dis, 2011, **26**(2): 315-329
- [21] Puig B, Gómez-Isla T, Ribé E, *et al.* Expression of stress-activated kinases c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK-P) and p38 kinase (p38-P), and Tau hyperphosphorylation in neurites surrounding betaA plaques in APP Tg2576 mice. Neuropathol Appl Neurobiol, 2004, **30**(5): 491-502
- [22] Ferrer I, Blanco R, Carmona M, *et al.* Phosphorylated map kinase (ERK1, ERK2) expression is associated with early Tau deposition in neurones and glial cells, but not with increased nuclear DNA vulnerability and cell death, in Alzheimer disease, Pick's disease, progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. Brain Pathol, 2001, **11** (2): 144-158
- [23] Veeranna, Kaji T, Boland B, *et al.* Calpain mediates calcium-induced activation of the Erk1, 2 MAPK pathway and cytoskeletal phosphorylation in neurons relevance to Alzheimer's disease. Am J Pathol, 2004, **165** (3): 795-805
- [24] Pei J J, Braak H, An W L, *et al.* Up-regulation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2 and MEK1/2 is associated with the progression of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. Brain Res Mol Brain Res, 2002, **109** (1-2): 45-55
- [25] Nemoto T, Miyazaki S, Kanai T, *et al.* Nav1.7- $\text{Ca}^{2+}$  influx-induced increased phosphorylations of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and p38 attenuate tau phosphorylation *via* glycogen synthase kinase-3beta: priming of Nav1.7 gating by ERK and p38. Eur J Pharmacol, 2010, **640**(1-3): 20-28
- [26] 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
- [27] Schechter R, Beju D, Miller K E. The effect of insulin deficiency on Tau and neurofilament in the insulin knockout mouse. Biochem Biophys Res Commun, 2005, **334** (4): 979-986

## The Effect and Mechanism of Rosiglitazone on Learning and Memory Impairment of Alzheimer-like Mice\*

XIONG Hui, DING Ling, WANG Jing-Jing, ZHENG Chen, SONG Jin-Zhi, PAN Bin, DENG Yan-Qiu\*\*

(Basic Medical College, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**Abstract** Research on the protective effect and mechanism of rosiglitazone on learning and memory impairment of AD-like mice induced by streptozotocin (STZ) intracerebroventricular (i.c.v.) injection. STZ i.c.v. injection was used to establish AD mice model and the treatment mice were administered orally with rosiglitazone for 30 days. Morris water maze was applied to detect the learning and memory ability of mice and Western blot and immunofluorescence to analyze the phosphorylation levels of Tau, the expression levels of phosphorylation and glycosylation of neurofilaments (NFs) protein, the expression levels of JNK and ERK. The microtubule binding assay was used to detect the assembly function of Tau binding with microtubule. The degenerative neurons were labeled by Fluoro -Jade B (FJB). Compared with the control group, the escape latency and path length were increased of the model group with less number of crossing hidden platform, and the Tau and NFs proteins were hyperphosphorylated and the glycosylation of NFs protein were lower. But compared with the model group, the rosiglitazone significantly improved the learning and memory ability of mice and decreased the hyperphosphorylated levels of Tau and NFs proteins, increased the glycosylation of NFs protein, and increased the microtubule-binding of Tau in treated-mice. The phosphorylated expression levels of JNK of model group were higher than the other two groups, while ERK1 were lower, but there was no significant difference of ERK2 in three groups. And the numbers of FJB-degenerative neurons of model group were much more than the other two groups. Rosiglitazone could protect learning and memory impairment of AD-like mice induced by STZ i.c.v. injection, which may be related to ameliorate the insulin signal pathway, decrease the hyperphosphorylation of Tau and NFs proteins, and protect from the neural degeneration.

**Key words** rosiglitazone, Alzheimer disease, streptozotocin, Tau, neurofilaments

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2013.00033

---

\*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China(30973156, 81270422).

\*\*Corresponding author.

Tel: 86-22-83336830, E-mail: dengyanqiu66@gmail.com

Received: January 18, 2013 Accepted: April 3, 2013