

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2012.02.002

Alzheimer 病胰岛素信号传导通路的研究^{*}

杜怡峰 闫 鹏 韩晓娟

(山东省立医院神经内科, 山东 济南 250021)



杜怡峰, 济宁市嘉祥县人, 医学博士, 博士后。1978 级校友。现任山东省立医院神经内科主任、主任医师, 山东大学教授、博士研究生导师。兼任山东省医学会神经内科分会主任委员, 山东省医师协会神经内科医师分会主任委员, 中国阿尔茨海默病协会(ADC)副主任委员, 中国老年学学会老年医学委员会认知障碍专家委员会副主任委员, 中华医学会神经病学分会痴呆与认知障碍学组委员, 中国药理学会抗衰老及老年痴呆专业委员会委员, 中国医师协会神经内科医师分会委员, 中国医师协会老年医学医师分会常委, 中国康复学会脑血管病专业委员会委员, 中国老年保健协会脑保健专业学术委员会委员。《中华老年心脑血管病杂志》编委,《中华老年多器官疾病杂志》编委,《中国神经免疫学和神经病学杂志》编委,《山东大学学报(医学版)》编委,《老年痴呆研究通讯》编委。

致力于阿尔茨海默病(Alzheimer's disease)和脑血管疾病的发病机制、早期诊断及治疗的基础与临床研究工作。近年承担国家自然科学基金, 山东省自然科学基金, 山东省科技攻关计划项目, 山东省医药卫生科技发展计划重点项目等多项科研课题, 在国内外学术期刊发表论文 110 余篇。

摘 要 目的 探讨胰岛素信号传导通路相关蛋白变化在 Alzheimer 病发生发展中的作用。**方法** 1) 体外原代培养 Wistar 胎鼠基底前脑胆碱能神经元并鉴定, 以不同终浓度的纤维化 A β_{1-40} 分别对原代培养的神经细胞进行干预, 荧光显微镜观察细胞形态学变化, 四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测细胞活性, 提取细胞总蛋白行免疫印迹(Western Blotting)检测神经元胰岛素信号转导通路相关蛋白的表达。2) 用微量注射器在痴呆模型组大鼠侧脑室注射 A β_{1-42} 寡聚体 5 μ l, 同样的方法于盐水(NS)组大鼠注射生理盐水 5 μ l, 正常组大鼠不做任何处理。2 周后通过 Y-迷宫实验检测大鼠行为学改变并取海马组织进行免疫组化染色。**结果** 1) 以 2 μ mol/L、5 μ mol/L 和 10 μ mol/L 三个终浓度纤维化 A β_{1-40} 进行干预的胆碱能神经元, 细胞形态学观察及 MTT 实验均显示神经元活性有下降趋势, 且下降程度与纤维化 A β_{1-40} 浓度呈正相关。以 5 μ mol/L 浓度的纤维化 A β_{1-40} 对细胞进行不同时长(24h, 48h, 72h)干预后, 细胞形态学观察及 MTT 实验均显示神经元活性的下降程度与纤维化 A β_{1-40} 的干预时长呈正相关。2) 以 2 μ mol/L、5 μ mol/L 和 10 μ mol/L 三个终浓度纤维化 A β_{1-40} 进行干预的胆碱能神经元, 其胰岛素信号传导通路相关蛋白中, InsR(Insulin Receptor)、IRS-1[Insulin Receptor Substrate-IRS-1、Akt/PKB(serine/threonine protein kinase B)]及 Bcl-2 的表达减低, 减低程度与纤维化 A β_{1-40} 干预浓度呈正相关; 以 5 μ mol/L 终浓度的纤维化 A β_{1-40} 对细胞进行不同时长(24h, 48h, 72h)干预后, InsR、IRS-1、Akt/PKB 及 Bcl-2 表达的减低程度与纤维化 A β_{1-40} 干预时长呈正相关。3) AD 模型组大鼠海马区神经元 InsR、IRS-1 和 Akt/PKB 比对照组表达减低($P < 0.05$), 差异有统计学意义。**结论** A β 可引起神经元损害和学习记忆功能障碍, 其主要机制可能是介导了海马神经元胰岛素信号转导通路功能异常。

关键词 阿尔茨海默病; β 淀粉样蛋白; 神经元; 胰岛素信号转导通路; 大鼠

中图分类号: R742.5 文献标志码: A 文章编号: 1000-9760(2012)04-084-09

Study on the impairment of insulin signal transduction pathway in Alzheimer's disease

DU Yi-feng, YAN Peng, HAN Xiao-juan

(Department of Neurology, Shandong Provincial Hospital, Jinan 250021, China)

Abstract: Objective To explore the impact of fibrillar A β_{1-40} and soluble A β oligomers on the insulin signal

^{*} [基金项目] 基金项目: 山东省自然科学基金项目(Y2008C116)

transduction pathway in Alzheimer's disease(AD). **Methods** 1) Primitive rat basal forebrain neurons were cultured and evaluated with. Morphologic, cellular vigor and IR、IRS-1、Akt/PKB、CREB、Bcl-2 expressing changes were observed by fluorescent microscope, MTT assay, Western Blot respectively when the neurons were exposed to fibrillar $A\beta_{1-40}$ with different ending concentrations(0.1 $\mu\text{mol/L}$, 1.0 $\mu\text{mol/L}$, 2.0 $\mu\text{mol/L}$, 5.0 $\mu\text{mol/L}$, 10.0 $\mu\text{mol/L}$) and different duration. 2) 5 μl soluble $A\beta$ oligomers were injected into lateral ventriculus of the model group by a microinjector under the stereotaxic apparatus. 5 μl saline solution was injected into the NS group in the same way, and the control group received nothing. The behavior was evaluated by the Y-maze test after 2 weeks. And then the hippocampus was removed and underwent immunohistochemical staining. **Results** 1) After being exposed to fibrillar $A\beta_{1-40}$ for 48h, the neurons exposed to higher ending concentration(2.0, 5.0 and 10.0 $\mu\text{mol/L}$) of fibrillar $A\beta_{1-40}$ showed significant changes in morphology and cellular vigor: average process quantity of the neurons, average process length and the length of the longest process of neurons were decreased significantly, and the results of MTT assay showed that average OD values were significantly decreased. 2) After being exposed to the three higher concentrations(2.0, 5.0 and 10.0 $\mu\text{mol/L}$) of fibrillar $A\beta_{1-40}$, the expression of InsR、IRS-1、Akt/PKB and Bcl-2 were significantly decreased. When the neurons were cultured with 5 mol/L fibrillar $A\beta_{1-40}$ for different duration(24h, 48h, 72h), the above indexes were decreased by time dependency. 3) Compared with the control group, the expression of InsR、IRS-1, and Akt/PKB in AD group were decreased($P < 0.05$), which was statistically significant. **Conclusion** Conclusion downregulated insulin signaling pathway induced by fibrillar $A\beta_{1-40}$ in cultured primitive rat basal fore-brain cholinergic neurons, which is dose-dependent, may contribute to the death and loss of cholinergic neurons in AD. Soluble $A\beta$ oligomers could give rise to learning and memory disability. The mechanism may be that it lead to abnormality of the insulin signal transduction pathway of hippocampus neurons.

Key words: Alzheimer's Disease; Amyloid protein; Neuron; Insulin signaling transduction pathway; Rats

Alzheimer 病 (Alzheimer's dementia, AD) 是发生在老年期、不可逆转的、渐进性的、以认知和精神行为异常为主的脑变性疾病。目前 AD 较为肯定的病理变化是基底前脑胆碱能神经元的选择性丢失、减少^[1], 在病变部位有特征性的细胞外大量 β -淀粉样蛋白 (β -amyloid peptide, $A\beta$) 沉积形成的老年斑 (senile plaque, SP) 和细胞内神经原纤维缠结形成, 而老年斑中的主要成分即为 $A\beta_{1-40}$ 和 $A\beta_{1-42}$ 。然而迄今为止有关胆碱能神经元丢失和减少的原因和机制尚不明确, 目前认为胆碱能神经元的这种减少和丢失可能与神经保护性信号转导通路障碍有关^[2], 而其中胰岛素信号转导通路的损害可能扮演重要角色^[3-7]。

研究表明^[8-9], β -淀粉样蛋白的多种分子片段均可在体外诱导离体培养的细胞发生活力下降或至凋亡, 但 β -淀粉样蛋白对胆碱能神经元毒性作用的确切机制仍不清楚, 尤其目前有关 β -淀粉样蛋白对胆碱能神经元胰岛素信号转导通路的影响鲜有报道。本研究基于体外培养的 wistar 胎鼠基底前脑神经元模型和侧脑室 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体注射 AD 模型, 观察纤维化 $A\beta_{1-40}$ 和 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体对细胞的活性和胰岛素信号传导通路相关蛋白表达和模型大鼠行为学改变的影响, 以期阐明 AD 的发生机制

提供进一步的理论支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 实验用 wistar 孕鼠 (20 只, 孕 19 天, 300 ~ 350g); 和健康成年 Wistar 大鼠 36 只, 雄性, 3 ~ 4 月龄, 体重 $225\text{g} \pm 25\text{g}$, 由山东大学实验动物研究中心提供。

1.1.2 实验试剂 DMEM/F12 培养基、青链霉素液体购自 hyclone 公司; 胰蛋白酶、D-hanks 缓冲液、PBS 缓冲液购自 GIBCO 公司; 胎牛血清购自 CLARK 公司; 重组的大鼠 beta-神经生长因子 (β -NGF) 购自 R&D 公司; 兔抗大鼠胆碱乙酰转移酶 (Choactase, ChAT)、bcl-2 抗体购自 santa cruz 公司; 兔抗大鼠 Akt/PKB、CREB 和 IRS-1 抗体均购自 abcam 公司; 小鼠抗大鼠 InsR_{β} subunit 抗体购自 MILLIPORE 公司; 神经丝蛋白抗体 (NF-200kD) 购自 CHEMICON 公司; $A\beta_{1-40}$ 和 $A\beta_{1-42}$ (beta-amyloid protein 1-40) 和阿糖胞苷购自 Sigma 公司; 免疫组化染色试剂盒属中杉金桥公司产品; 其余试剂均为国产试剂。

1.2 实验方法

1.2.1 胆碱能神经元的体外培养及鉴定 苯巴比

妥(3%)腹腔注射麻醉 wistar 孕大鼠,无菌条件下取出胎鼠,以显微镊分离出基底前脑组织,置 D-hank's 液中于解剖显微镜下去除脑膜,后将脑组织剪成碎块,以 0.125%胰蛋白酶 37℃ 消化 15min,然后以含 15%胎牛血清的 DMEM/F12(1:1)终止消化,200 目无菌滤网过滤,低温 1000rpm 离心 4min,弃上清,加入 DMEM/F12(1:1)培养基(含 15%胎牛血清、100UI/ml 青霉素、100 g/ml 链霉素及 100ng/ml 重组大鼠 β -NGF,吸管吹打制成单细胞悬液,调整接种浓度,接种至 0.05ng/ml 多聚赖氨酸包被的培养皿(接种密度为 2×10^6 /ml)、12 孔培养板(接种密度为 6×10^5 /ml)和 96 孔培养板(接种密度为 4×10^5 /ml)中,5%CO₂、37℃ 细胞培养箱中进行培养。第 3~5 天加入阿糖胞苷(终浓度为 5 mol/L)以抑制胶质细胞分裂。培养皿内收获细胞提取总蛋白进行免疫印迹(Western Blotting);12 孔板内铺盖玻片行细胞免疫荧光和进行形态学观察;96 孔培养板内培养细胞行 MTT 实验。

以胆碱乙酰转移酶(ChAT)细胞免疫荧光法进行鉴定:12 孔板内细胞爬片 7d 后,以 4%多聚甲醛(4℃)固定 30min,0.3% Triton-X 作用 20min,PBS 洗 3 遍,10%BSA 室温封闭 1h,弃 BSA,加羊抗大鼠 ChAT 抗体(1:100),湿盒中 4℃ 过夜,PBS 洗 3 遍,避光条件下加 FITC 标记小鼠抗羊 IgG(1:100)37℃ 孵育 30min,避光条件下滴加 Hoechst 33342 染液,5 min 后去除,PBS 洗 3 遍,吹干,50%缓冲甘油封片。荧光显微镜下观察染色结果,绿色荧光为 ChAT 阳性细胞,蓝色荧光为细胞核。

1.2.2 体外培养的胆碱能神经元药物处理及分组

A β_{1-40} 溶于 25mmol/L 的 PBS 缓冲液中,至终浓度 100 mol/L,于 37℃ 温箱中孵育 7d,即得纤维化 A β_{1-40} ,使用前以超声波混匀。

不同浓度药物干预相同时间段(48h):实验分为 6 组,包括空白对照组和 5 个纤维化 A β_{1-40} 干预组,干预组的纤维化 A β_{1-40} 终浓度分别为 0.1、1.0、2.0、5.0 和 10 μ mol/L。细胞培养至第 7 天在 5 个药物干预组加纤维化 A β_{1-40} 至不同的终浓度,对照组加等量的 25mmol/L PBS 缓冲液,孵育 48h 后进行形态学观察、总蛋白提取以及免疫印迹。

相同浓度药物(5 μ mol/L)干预不同时间段:

实验分为 6 组,分别为 24h 空白对照组,纤维化 A β_{1-40} 干预 24h 组,48h 空白对照组,纤维化 A β_{1-40} 干预 48h 组,72h 空白对照组以及纤维化 A β_{1-40} 干预 72h 组。细胞培养至第 7 天于 3 个药物干预组分别加纤维化 A β_{1-40} 至终浓度 5 μ mol/L,而于 3 个对照组则分别加入等量体积的 25mmol/L PBS 缓冲液,干预后 24h、48h、72h 分别进行形态学观察、细胞总蛋白提取及免疫印迹。

1.2.3 体外培养的胆碱能神经元 MTT 实验 在对照组前设一行 4 个孔为空白对照组,不接种细胞以消除背景,96 孔板边缘 36 个孔分别均加入 200 μ l 无菌 PBS 缓冲液以消除边缘效应;于终止培养前 4h,每孔加入 20 μ l MTT(5 mg/ml PBS)继续孵育 4h 后,吸弃培养液,加入 DMSO 150 μ l,室温下反应 10 min,待颗粒溶解后置于酶标仪上,测实验波长为 590nm 和参考波长为 630nm 每孔的吸光度值。

1.2.4 体外培养的胆碱能神经元形态学检测 对照组及各药物干预组分别于相应时间点终止培养,行神经丝蛋白抗体(NF-200kD)细胞免疫荧光染色,荧光显微镜下观察,每组随机选取 25 个染色阳性且未与其他神经元发生连接的孤立神经元,计数其各自的突起数量后求各组平均值,并应用 ACT-2U 软件测量各组神经元的细胞平均突起长度以及最长突起长度(胞体至突起末端长度)后求出各组平均值。

1.2.5 体外培养的胆碱能神经元 Western Blot 检测胰岛素信号传导通路相关蛋白的表达 培养终止后,培养皿中弃去培养基,以 PBS 洗涤 3 次,加入适量 RIPA 裂解液(含 1/100 体积的蛋白酶抑制剂 PMSF)冰浴中裂解细胞,收集蛋白,BCA 法蛋白定量。取 50 μ g 总蛋白以 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳,后电转至 NC 膜,5%脱脂牛奶(以 TBST 配制)37℃ 封闭 1h,后加入一抗[Bcl-2(1:400)、CREB(1:1000)、Akt/PKB(1:1000)、InsR β subunit(1:200)、IRS-1(1:500)]于 4℃ 封闭过夜,TBST 洗涤 10min $\times$ 3 次,辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1h,TBST 洗涤 10min $\times$ 3 次,ECL 法显影。以 β -actin 为内参,每组实验重复 3 次,对 ECL 显色的阳性条带以凝胶成像分析系统进行灰度分析。使用目的蛋白灰度/ β -actin 灰度比值作为统计数据。

1.3 AD 动物模型建立

1.3.1 实验动物分组 将大鼠随机分成 3 组,即正常对照组、生理盐水组(NS 组)和 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体注射组(AD 组),各组大鼠数量均为 12 只($n=12$)。

1.3.2 AD 大鼠模型的制备 AD 组大鼠在立体定位仪下(以前囟定位,定位于前囟后 1.2mm,左侧旁开 2mm,深度为 4.0mm),用微量注射器于双侧侧脑室注射浓度为 $100\mu\text{mmol/L}$ 的 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体 $5\mu\text{L}$ 。为使药物得到充分扩散,注射速度缓慢并在注射完毕后留针 1min。NS 组大鼠同样方法注射生理盐水 $5\mu\text{L}$,正常对照组不做任何处理。常规饲养 1 周后,各组大鼠重复 1 次本组操作,然后再饲养 1 周。

1.3.3 模型大鼠的行为学检测 于第 2 次注射完毕饲养一周后采用 Y-迷宫检测大鼠学习和记忆能力。以学习获得次数增加,记忆获得次数减少的大鼠为认知功能减退的大鼠。

1.3.4 模型大鼠海马的取材和固定 用浓度为 20%的乌拉坦溶液按 4 ml/kg 的剂量对大鼠行腹腔注射。在麻醉后立即开胸暴露心脏,经左心室插管,同时剪开右心房,快速灌注生理盐水至肝脏变白。再快速灌注浓度为 4%的多聚甲醛 100 ml,然

后再缓慢灌注 30min,至大鼠四肢僵硬为满意。取鼠脑海马注射点前后约 3mm 厚的标本,浸泡在 40g/L 的多聚甲醛中固定 48h。

1.3.5 模型大鼠海马的免疫组织化学分析 将固定好的海马组织按顺序脱水、透明、浸蜡及石蜡包埋后,取大鼠海马冠状位切片,片厚 $5\mu\text{m}$ 。然后用 InsR 抗体(1:100)、IRS-1 抗体(1:200)和 AKT/PKB 抗体(1:200)对海马神经元行免疫组化染色。采用 SP 法,DAB 显色,阳性产物为棕黄色。阴性对照组不加一抗以正常血清替代。

1.4 统计学处理

每个实验设 3 个批次,平均突起数量、平均突起长度、最长突起长度、MTT 实验的 OD 值、免疫印迹结果的半定量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,照片的灰度值用 IPP6.0 软件分析,全部数据采用 SPSS10.0 统计软件进行处理,多组间均数比较采用方差分析,两组间均数比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 认为具有统计学差异。

2 结果

2.1 胆碱能神经元的鉴定

培养的细胞在第 7 天行 ChAT 细胞免疫荧光鉴定,示 95%以上为阳性神经元(见图 1)。

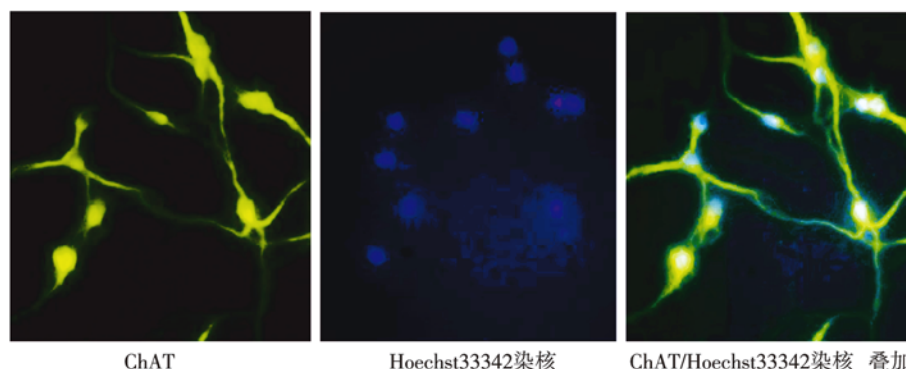


图 1 细胞免疫荧光鉴定胆碱能神经元($\times 400$)

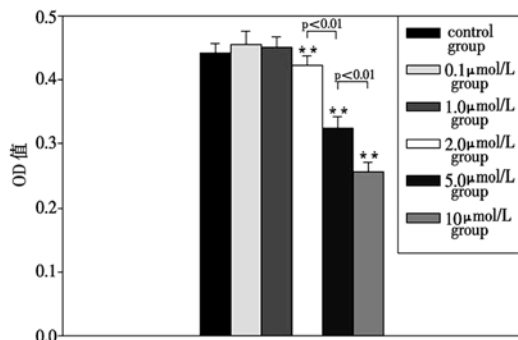
2.2 纤维化 $A\beta_{1-40}$ 对胆碱能神经元细胞活力的影响

2.2.1 不同浓度药物干预相同时间段(48h) 以 5 种不同浓度的纤维化 $A\beta_{1-40}$ 对培养 7d 的胆碱能神经元进行干预,48h 后行 MTT 实验。结果显示,在纤维化 $A\beta_{1-40}$ 干预终浓度较低($0.1\mu\text{mol/L}$ 及 $1.0\mu\text{mol/L}$)的情况下,OD 值均无明显变化;而

在纤维化 $A\beta_{1-40}$ 干预终浓度较高($2.0\mu\text{mol/L}$, $5.0\mu\text{mol/L}$ 和 $10\mu\text{mol/L}$)的情况下,OD 值均显示出剂量依赖性的降低,与对照组相比,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。(见图 2)

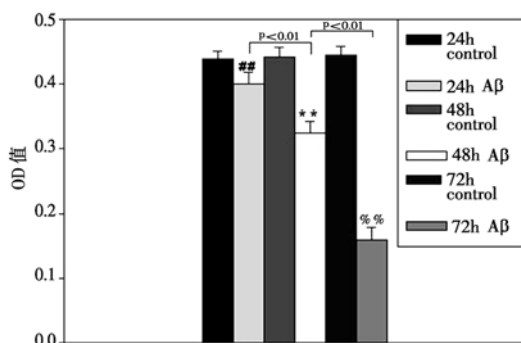
2.2.2 相同浓度药物($5\mu\text{mol/L}$)干预不同时间段 以 $5\mu\text{mol/L}$ 终浓度的纤维化 $A\beta_{1-40}$ 进行不同时间段(24h, 48h 和 72h)的干预,结果发现 OD 值

均随干预时间的延长而降低,与各自的对照组相比,差异均具有统计学意义($P < 0.05$),而各不同时间段的对照组之间相比无明显差异。(见图3)



(* * $P < 0.01$, 与对照组相比)

图2 不同浓度纤维化 $A\beta_{1-40}$ 对培养胆碱能神经元活力的影响



(## $P < 0.01$, 与 24h 对照组相比; * $P < 0.01$, 与 48h 对照组相比; %% $P < 0.01$, 与 72h 对照组相比)

图3 终浓度 $5 \mu\text{mol/L}$ 的纤维化 $A\beta_{1-40}$ 干预不同时间段后对培养胆碱能神经元活力的影响

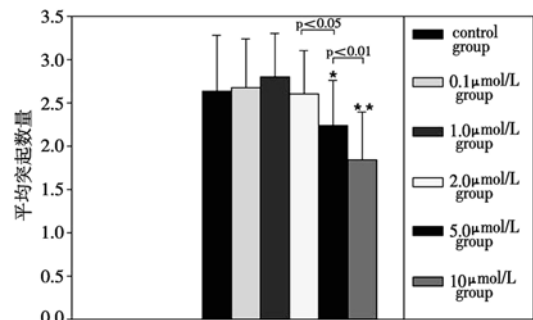
2.3 纤维化 $A\beta_{1-40}$ 对胆碱能神经元细胞形态的影响

2.3.1 不同浓度药物干预相同时间段(48h) 以 5 种不同浓度的纤维化 $A\beta_{1-40}$ 对培养 7d 的胆碱能神经元进行干预,48h 后观察细胞形态。结果显示:1)细胞平均突起数量:在纤维化 $A\beta_{1-40}$ 干预终浓度较低($0.1, 1.0$ 及 $2.0 \mu\text{mol/L}$)的情况下,细胞平均突起数量无明显变化;而在纤维化 $A\beta_{1-40}$ 干预终浓度较高($5.0 \mu\text{mol/L}$ 及 $10 \mu\text{mol/L}$)的情况下,细胞平均突起数量显示出剂量依赖性的降低,与对照组相比,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。2)平均突起长度及最长突起长度:在纤维化 $A\beta_{1-40}$ 干预终浓度较低(0.1 及 $1.0 \mu\text{mol/L}$)的情况下,平均突起长度和最长突起长度均无明显变化;而在纤维化 $A\beta_{1-40}$ 干预终浓度较高($2.0, 5.0$ 和 $10 \mu\text{mol/L}$)的情况下,平均突起长度和最长突起长度均显示出剂量依赖性的降低,与对照组相比,

差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。(见图4,5)

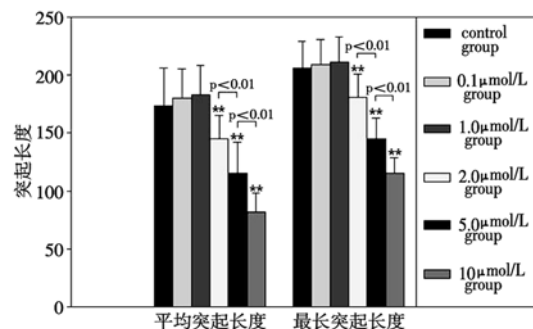
2.3.2 相同浓度药物($5 \mu\text{mol/L}$)干预不同时间段

以 $5 \mu\text{mol/L}$ 终浓度的纤维化 $A\beta_{1-40}$ 进行不同时间段(24h、48h 和 72h)的干预,结果发现细胞平均突起数量、平均突起长度、最长突起长度均随干预时间的延长而降低,与各自的对照组相比,差异均具有统计学意义($P < 0.05$),而各不同时间段的对照组之间相比无明显差异。(见图6,7)



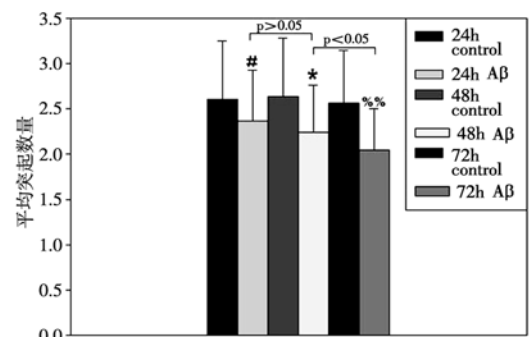
(* $P < 0.05$, * * $P < 0.01$, 与对照组相比)

图4 不同浓度纤维化 $A\beta_{1-40}$ 对培养胆碱能神经元平均突起数量的影响



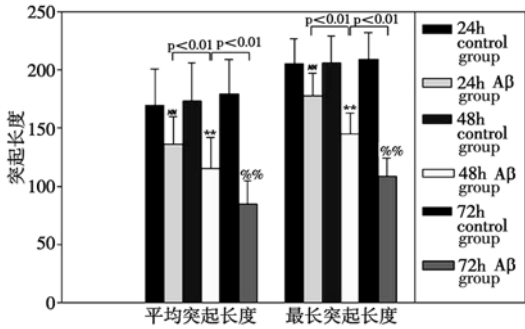
(* * $P < 0.01$, 与对照组相比)

图5 不同浓度纤维化 $A\beta_{1-40}$ 对培养胆碱能神经元平均突起长度以及平均最长突起长度的影响



(# $P < 0.05$, 与 24h 对照组相比; * $P < 0.05$, 与 48h 对照组相比; %% $P < 0.01$, 与 72h 对照组相比)

图6 终浓度 $5 \mu\text{mol/L}$ 的纤维化 $A\beta_{1-40}$ 干预不同时间段后对培养胆碱能神经元平均突起数量的影响



(## $P < 0.01$, 与 24h 对照组相比; * $P < 0.01$, 与 48h 对照组相比; %% $P < 0.01$, 与 72h 对照组相比)

图 7 终浓度 $5\mu\text{mol/L}$ 的纤维化 $\text{A}\beta_{1-40}$ 干预不同时间段后对培养胆碱能神经元平均突起长度以及平均最长突起长度的影响

2.4 纤维化 $\text{A}\beta_{1-40}$ 对胆碱能神经元胰岛素信号传导通路相关蛋白 InsR、IRS-1、Akt/PKB、CREB 及 Bcl-2 表达的影响

体外培养胆碱能神经元 7d 时给予纤维化 $\text{A}\beta_{1-40}$ 干预。于不同剂量组分别给予纤维化 $\text{A}\beta_{1-40}$ 干预,然后于 24h、48h、72h 分别提取相应组别的细胞总蛋白,进行免疫印迹。

2.4.1 不同浓度纤维化 $\text{A}\beta_{1-40}$ 干预 48h 后,提取培养胆碱能神经元总蛋白进行免疫印迹实验,检测胰岛素信号传导通路相关蛋白的表达变化情况(见图 8)

InsR、IRS-1、Akt/PKB 及 Bcl-2 的表达:在纤维化 $\text{A}\beta_{1-40}$ 干预终浓度较低 ($0.1\mu\text{mol/L}$ 及 $1.0\mu\text{mol/L}$) 的情况下,InsR、IRS-1、Akt/PKB 及 Bcl-2 的表达均无明显变化;当纤维化 $\text{A}\beta_{1-40}$ 干预终浓度较高 ($2\mu\text{mol/L}$ 、 $5\mu\text{mol/L}$ 及 $10\mu\text{mol/L}$) 时,InsR、IRS-1、Akt/PKB 及 Bcl-2 的表达均随纤维化 $\text{A}\beta_{1-40}$ 干预终浓度的升高而呈现出明显的降低趋势,干预后 24h 组、48h 组、72h 组与对照组的差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$),同时这 3 组之间差异亦均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

CREB 的表达:在给予纤维化 $\text{A}\beta_{1-40}$ 干预 48h 后,5 个药物浓度组均显示 CREB 的表达无明显变化。

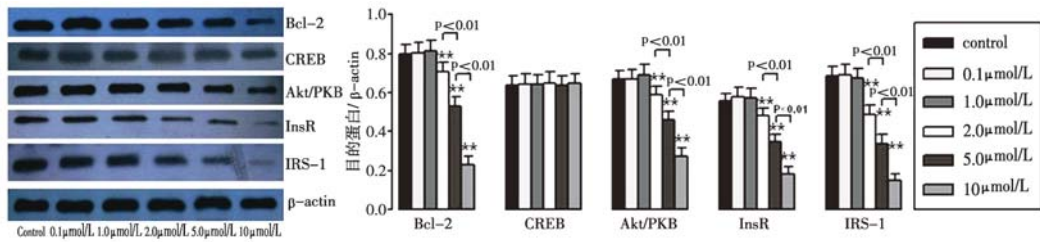


图 8 不同浓度纤维化 $\text{A}\beta_{1-40}$ 的干预对基底前脑胆碱能神经元胰岛素信号转导通路相关蛋白影响的对比

2.4.2 无药物干预 0h、24h、48h 及 72h 对照组之间胆碱能神经元胰岛素信号传导通路相关蛋白对比(见图 9)

细胞培养 7d 后,在没有药物干预的前提下,提取 0h、24h 后、48h 后、72h 后细胞总蛋白,进行免疫印迹实验,结果显示,InsR、IRS-1、Akt/PKB、CREB 及 Bcl-2 的表达随培养时间的延长并没有明显变化,提示对 5 种相关蛋白的检测 24h 对照组、48h 对照组、72h 对照组具有同等对比效价。

2.4.3 以 $5\mu\text{mol/L}$ 终浓度的纤维化 $\text{A}\beta_{1-40}$ 对所培养胆碱能神经元进行不同时长 (24h、48h 和 72h) 的干预,后分别提取各组细胞总蛋白进行免疫印迹实验,检测胰岛素信号传导通路相关蛋白的变化(见图 10),结果显示:

InsR、IRS-1、Akt/PKB 及 Bcl-2 的表达:与对照组相比,InsR、IRS-1、Akt/PKB 及 Bcl-2 的表达均随干预时间的延长而降低,差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$),而各不同时段组之间的差异亦均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

CREB 的表达:随着药物干预时间的延长,CREB 的表达没有表现出明显的变化。

2.5 各组大鼠学习、记忆能力的变化

Y-迷宫实验结果见表 1。由表 1 可见,AD 组大鼠学习获得次数比后两组多,记忆获得次数比后两组少,即 AD 组大鼠学习和记忆功能均减退。

表 1 各组大鼠学习、记忆能力的比较 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	学习获得次数	记忆获得次数
AD 组	73.50 ± 11.41	3.63 ± 1.69
NS 组	$50.82 \pm 6.09^*$	$7.02 \pm 1.32^*$
正常组	$44.76 \pm 8.33^*$	$7.85 \pm 0.91^*$

* $P < 0.05$ 示 AD 组 vs NS 组;AD 组 vs 正常组

2.6 各组大鼠海马组织免疫组化结果

AD 组大鼠海马区神经元 InsR、IRS-1 和 AKT/PKB 表达与正常组和盐水组相比减低,细胞着色浅(图 11、12、13)。

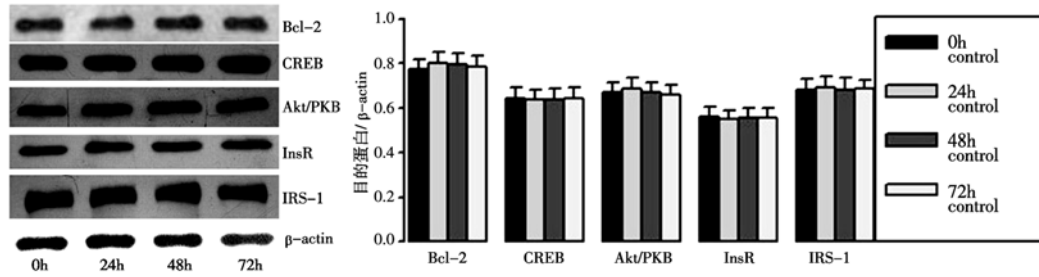


图9 空白 0h、24h、48h 和 72h 基底前脑胆碱能神经元胰岛素信号转导通路相关蛋白的相互对比

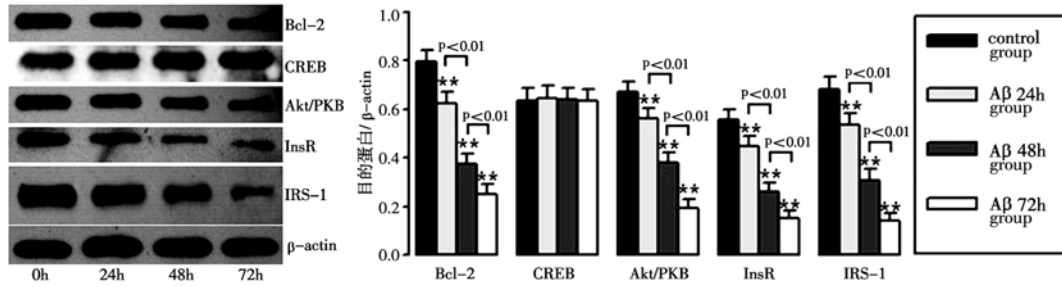
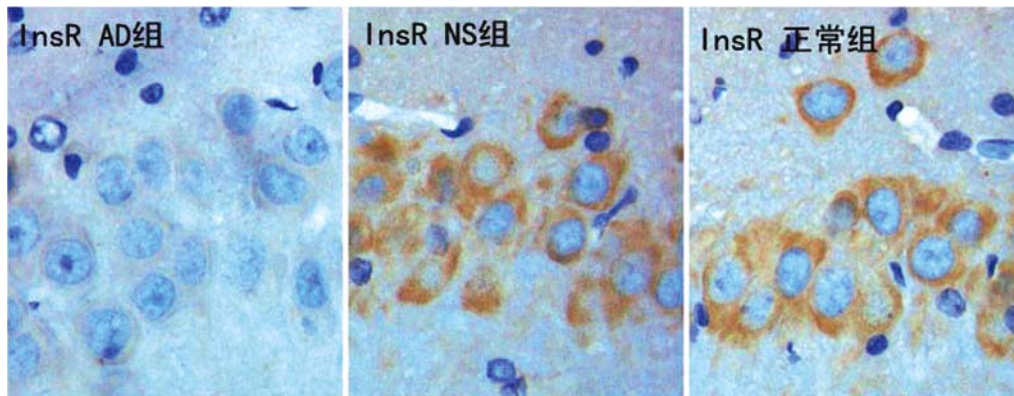
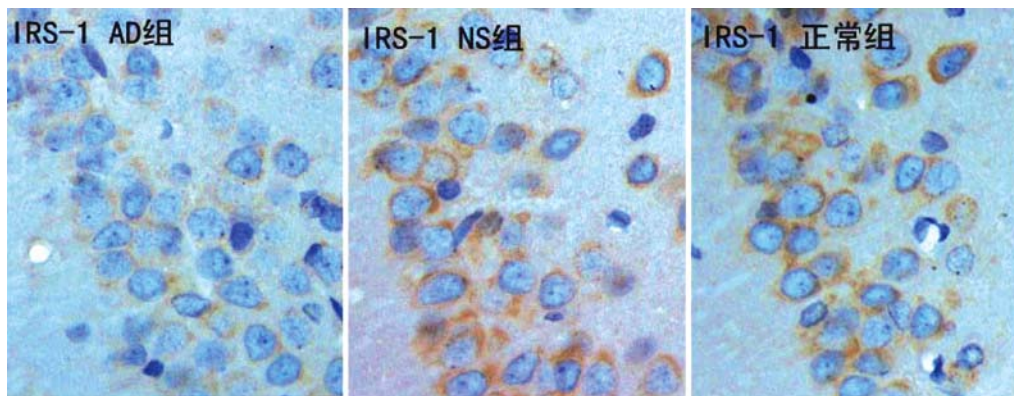


图10 5 μmol/L 纤维化 Aβ₁₋₄₀ 作用不同时间段后胰岛素信号转导通路相关蛋白的对比



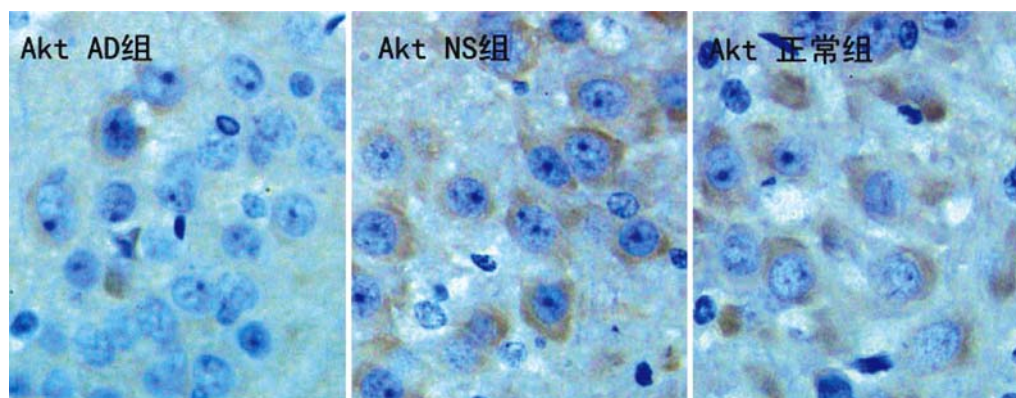
InsR 在 AD 组与 NS 组和正常组相比表达明显减低,胞浆着色更浅。其差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 在 NS 组和正常组表达无明显差异 ($P > 0.05$)。

图11 用 InsR 多克隆抗体免疫组化法对大鼠海马神经元染色 (×400)



IRS-1 在 AD 组与 NS 组和正常组相比表达明显减低,胞浆着色更浅。其差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 在 NS 组和正常组表达无明显差异 ($P > 0.05$)。

图12 用 IRS-1 多克隆抗体免疫组化法对大鼠海马神经元染色 (×400)



Akt 在 AD 组与 NS 组和正常组相比表达明显减低,胞浆着色更浅。其差异有统计学意义($P<0.05$);在 NS 组和正常组表达无明显差异($P>0.05$)。

图 13 用 Akt 多克隆抗体免疫组化法对大鼠海马神经元染色($\times 400$)

2.7 各组大鼠海马神经元 InsR、IRS-1 和 Akt/PKB 平均光密度值的比较

由表 2 可以看出,正常组和 NS 组 InsR、IRS-1 和 Akt/PKB 的平均光密度值相似,但比 AD 组高,说明在正常组和 NS 组细胞染色深,其差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 2 3 组大鼠海马神经元 InsR、IRS-1 和 Akt/PKB 平均光密度值的比较($\bar{x} \pm s, n=12$)

分组	InsR	IRS-1	Akt
AD 组	0.12 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.12 ± 0.03
NS 组	$0.40 \pm 0.02^*$	$0.39 \pm 0.06^*$	$0.38 \pm 0.03^*$
正常组	$0.38 \pm 0.07^*$	$0.35 \pm 0.03^*$	$0.35 \pm 0.06^*$

* $P<0.05$ 示 AD 组 vs NS 组;AD 组 vs 正常组

3 讨论

A β 是 AD 患者老年斑(SP)的核心和主要成分,其对神经元细胞的毒性作用在 AD 的发病中起重要作用,而 A β 的致凋亡作用也一直是研究者关注的热点^[9]。然而到目前为止,有关 β 淀粉样蛋白对神经细胞毒性作用的机制尚不清楚,Hugon J 等^[10]的研究发现,A β 引起神经细胞凋亡可能通过 caspase(半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶)起作用;而另外的有关研究^[11]则发现 A β 能够通过诱导胶质细胞 iNOS 表达,产生大量的 NO,杀伤神经元,因此有关 A β 的毒性作用机制仍需进一步的深入研究。

在中枢神经系统,胰岛素可作为神经营养因子而发挥促进细胞存活的作用,胰岛素通过与细胞膜上的 InsR(胰岛素受体)结合,使胰岛素受体底物磷酸化,激活胰岛素受体底物-1(IRS-1),通过

PI3K-Akt 途径激活 CREB,并使 CREB 磷酸化,最后通过靶位基因 Bcl-2 完成细胞存活和保护作用。有关研究显示在敲除小鼠胰岛素受体底物 I(IRS-1)后,可阻断胰岛素/IGF-I 信号通路,导致 GSK-3 活性增高,进而引起 tau 的磷酸化水平增加,在细胞内聚集为双螺旋丝^[5],最终可造成神经元的死亡和丢失。近年来,胰岛素信号转导通路障碍与 AD 之间的关系被愈来愈多的关注,Hoyer^[12-15]提出了散发性 AD 是“脑型 NIDDM(非胰岛素依赖性糖尿病)”的假说,而恰恰在所有 AD 病例中仅有一小部分(大约 5%~10%)的病人是由于基因突变所致,而大部分病人是散发的。我们的研究发现,低浓度的纤维化 A β_{1-40} 对胆碱能神经元胰岛素信号转导通路中 InsR、IRS-1、Akt/PKB、CREB 及 Bcl-2 的表达无明显改变,提示低浓度对神经元的胰岛素信号转导通路未造成明显影响。给予较高浓度纤维化 A β_{1-40} 干预后的胆碱能神经元 InsR、IRS-1、Akt/PKB 及 Bcl-2 的表达均显著下降,降低程度与纤维化 A β_{1-40} 浓度呈现正相关;并呈时间依赖性。我们推测 InsR 可能是纤维化 A β_{1-40} 的一个结合位点,而考虑到较低浓度的纤维化 A β_{1-40} 并未对胰岛素信号转导通路相关蛋白的表达造成影响,故 InsR 并非纤维化 A β_{1-40} 的首选结合位点。纤维化 A β_{1-40} 可能通过改变 InsR 的空间构象进而自起始受体阶段对胰岛素信号转导通路进行阻断。而 InsR 及 IRS-1 表达的下降可能与药物诱导的细胞内 Ca^{2+} 失衡有关,而其表达下调将会影响对下游 PI3K-Akt 途径的激活作用,造成 Bcl-2 表达的降低,进而引起神经元的活性下降甚至凋亡。另外,我们发现经 A β_{1-42} 处理过的大鼠出现学习记忆功能障碍,导致认知功能损伤,及 AD 模型大鼠海马

区 InsR 表达比正常组减少和 IRS-1 表达减低,这与 Steen E 等观察到的 AD 患者 IRS-1mRNA 水平比正常者低的结果是一致的^[16]。

有关研究^[17]显示,与非 AD 患者相比较,AD 患者脑海马组织 Akt/PKB、CREB、p-CREB 表达减少,而我们的实验结果显示 CREB 表达并没有明显改变,我们认为纤维化 A β_{1-40} 可能并不对 CREB 的表达直接造成影响,而是通过对 InsR、IRS-1 及 Akt 表达的影响而造成 CREB 磷酸化(p-CREB)的减少,p-CREB 表达的减少进而引起 Bcl-2 表达的下调。

另外,胰岛素或 IGF 还可在激活 PI3K-Akt/PKB 信号途径后,通过抑制糖原合成激酶-3 α (glycogen synthase kinase-3 α , GSK-3 α)的活性而减少 A β 的合成,GSK-3 α 已被证实可通过调节 γ -分泌酶的活性而促进 A β_{1-40} 、A β_{1-42} 的合成^[6]。有关研究证明 IDE(胰岛素降解酶)参与 A 的降解,在调节胞外 A β 水平过程中有着重要作用,而 IDE 则可能受胰岛素信号系统调节^[18]。Zhao 等^[7]认为,胰岛素所介导的 PI3K-Akt/PKB 信号途径可能参与对 IDE 活性的调节,继而影响胞外 A 的降解。因此,A β 对胰岛素信号转导通路的损害作用会进一步造成 A β 沉积的加重,进而进一步加重对神经元胰岛素信号转导通路的损害作用,形成恶性循环,最终造成神经元的减少和丢失。

我们的实验结果还显示在培养的胆碱能神经元接受低浓度纤维化 A β_{1-40} 干预后,形态学观察及 MTT 实验均显示其细胞活性有轻度升高,但最终统计学结果显示其与对照组之间的差异无统计学意义,我们推测低浓度纤维化 A β_{1-40} 对胆碱能神经元可能有类似神经营养或增强活性的作用,对此有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] Lehericy S, Hirsch E C, Cerera-Pierot P, et al. Heterogeneity and selectivity of the degeneration of cholinergic neurons in the basal forebrain of patients with Alzheimer's disease[J]. J Comp Neurol, 1993, 330(1): 15-31.
- [2] Magrane J, Rosen K M, Smith R C, et al. Intraneuronal beta-amyloid expression downregulates the Akt survival pathway and blunts the stress response[J]. J Neurosci, 2005, 25: 10960-10969.
- [3] 盛树力. 老年性痴呆及相关疾病[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2006: 226-263.
- [4] Xie L, Helmerhorst E, Taddei K, et al. Alzheimer's beta-Amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor[J]. J Neurosci, 2002, 22: RC221.
- [5] Schubert M, Schubert M, Brazil D P, et al. Insulin receptor substrate-2 deficiency impairs brain growth and promotes tau phosphorylation[J]. J Neurosci, 2003, 23: 7084-7092.
- [6] Phiel CJ, Wilson CA, Lee VM, et al. GSK-3 α regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides[J]. Nature, 2003, 423: 435-439.
- [7] Zhao L, Teter B, Morihara T, et al. Insulin-degrading enzyme as a downstream target of insulin receptor signaling cascade: implications for Alzheimer's disease intervention[J]. J Neurosci, 2004, 24: 11120-11126.
- [8] Watson D, Castano E, Kokjohn TA, et al. Physicochemical characteristics of soluble oligomeric A-beta and their pathologic role in Alzheimer's disease[J]. Neurol Res, 2005, 27(8): 869-881.
- [9] 郭春妮, 赵永波, 王晓梅, 等. 不同浓度的 A β (25-35)对原代培养的大鼠基底前脑胆碱能神经元生存活及 TrkA 表达的影响[J]. 中华神经科杂志, 2004, 37(3): 278.
- [10] Hugon J, Terro F, Esclaire F, et al. Markers of apoptosis and models of programmed cell death in Alzheimer's disease[J]. J Neural Transm Suppl, 2000, 59: 125-131.
- [11] Hu J, Van Eldik LJ. Glial-derived proteins active cultured astrocytes and enhance beta amyloid- induced glial activation[J]. Brain Res, 1999, 842: 46-54.
- [12] Hoyer S. Is sporadic Alzheimer disease the brain type of non-insulin dependent diabetes mellitus? A challenging hypothesis[J]. J Neural Transm, 1998, 105(4-5): 415-422.
- [13] Hoyer S, Lee SK, Löffler T, et al. Inhibition of the neuronal insulin receptor. An in vivo model for sporadic Alzheimer disease[J]. Ann N Y Acad Sci, 2000, 920(2): 256-258.
- [14] Hoyer S. The brain insulin signal transduction system and sporadic(type II) Alzheimer disease: an update[J]. J Neural Transm, 2002, 109(3): 341-360.
- [15] Hoyer S. Brain glucose and energy metabolism abnormalities in sporadic Alzheimer disease. Cause and consequences: an update[J]. Exp Gerontol, 2000, 35(9-10): 1363-1372.
- [16] Steen E, Terry BM, Rivera EJ, et al. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease-is this type 3 diabetes[J]. J Alzheimers Dis, 2005, 7(1): 63-80.
- [17] 孟艳, 许浩, 王蓉, 等. 阿尔茨海默病患者脑神经元存活信号转导的障碍[J]. 中华病理学杂志, 2002, 31(6): 502-505.
- [18] McDermott JR, Gibson AM. Degradation of Alzheimer's beta-amyloid protein by human and rat brain peptidases: involvement of insulin-degrading enzyme[J]. Neurochem Res, 1997, 22(1): 49-56.

(收稿日期 2012-04-02)