

硕士学位论文

**mTOR 在 STZ 诱导的
糖尿病大鼠认知功能障碍中的作用研究**

作者姓名： 方妮

学科专业： 内科学（内分泌）

学院（系、所）： 湘雅医院

指导教师： 吴静教授

中南大学

2012年05月

分类号 VDC _____

密级 _____

硕士学位论文

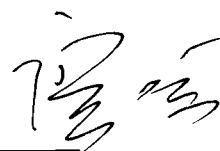
mTOR 在 STZ 诱导的 糖尿病大鼠认知功能障碍中的作用研究

The role of mTOR in cognitive dysfunction of STZ-induced diabetic rats

作者姓名： 方 妮
学科专业： 内科学（内分泌）
学院（系、所）： 湘雅医院
指导教师： 吴 静 教授

论文答辩日期 2012-5-30

答辩委员会主席



中南大学

二〇一二年五月

原创性声明

本人声明，所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了论文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中南大学或其他单位的学位或证书而使用过的材料。与我共同工作的同志对本研究所作的贡献均已在论文中作了明确的说明。

作者签名： 方超 日期： 2012 年 5 月 30 日

学位论文版权使用授权书

本人了解中南大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留学位论文并根据国家或湖南省有关部门规定送交学位论文，允许学位论文被查阅和借阅；学校可以公布学位论文的全部或部分内容，可以采用复印、缩印或其它手段保存学位论文。同时授权中国科学技术信息研究所将本学位论文收录到《中国学位论文全文数据库》，并通过网络向社会公众提供信息服务。

作者签名： 方超 导师签名 吴静 日期： 2012 年 5 月 30 日

摘要

目的:

研究链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 诱导的糖尿病大鼠海马组织哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR, 包括 p-mTOR 和 t-mTOR) 的变化与其糖尿病病程、糖尿病认知功能障碍及凋亡相关蛋白的相关性。

方法:

将雄性 SD 大鼠随机分成糖尿病组 (DM 组) 和正常对照组 (Con 组), 适应性喂养一周后, DM 组大鼠腹腔注射 STZ (60mg/kg), 3 天后检测尾静脉随机血糖 >16.7mmol/l 者, 视为造模成功 (n=27); 对照组大鼠 (n=21) 腹腔注射等量柠檬酸缓冲液。建模成功后将两组大鼠分别喂养 11 周、15 周和 20 周, 每周次大鼠数量均相等。当喂养到所需的周次时, 正常组和糖尿病组大鼠各取 5 只, 先行 Morris 水迷宫实验检测认知功能, 再采血检测血糖和血脂, 取新鲜海马组织液氮冻存, 用于提取组织蛋白行 p-mTOR、t-mTOR、Bax、Bcl-2 的 Western blotting 检测, 其余的大鼠用 4%多聚甲醛灌注后取脑, 石蜡切片行海马组织的免疫组化染色, 并用 tunel 法检测海马组织细胞凋亡情况。

结果:

1. Morris 水迷宫实验表明, 与正常对照组比较, 成模后 11 周, 糖尿病组大鼠的逃避潜伏期和原平台所在象限停留的时间差异均无统计学意义 ($P>0.05$); 成模后 15 及 20 周, 糖尿病组大鼠逃避潜伏期和原平台所在象限停留的时间差异有统计学意义 ($P<0.05$), 逃避潜伏期较正常组延长, 原平台所在象限停留的时间较正常组减少。在 3 组糖尿病大鼠中, 随病程延长, 逃避潜伏期逐渐延长 ($P<0.05$)、原

平台所在象限停留的时间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2. tunel 法检测结果显示,成模后 20 周,糖尿病组大鼠海马 CA1 区锥体细胞出现明显凋亡,阳性神经元的细胞核呈棕黄色,核固缩深染,正常组神经元胞核无棕黄着色。

3. 与正常对照组比较,成模后 11 周,糖尿病大鼠海马组织凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 及 Bax/Bcl-2 比值的差异无统计学意义($P>0.05$),成模后 15 及 20 周,糖尿病大鼠海马组织 Bcl 表达无明显变化, Bax 的表达及 Bax/Bcl-2 比值明显增加 ($P<0.05$),且随病程延长呈逐渐加重趋势。

4. 海马组织免疫组化结果显示,与同周次正常对照组比较,成模后 11 周,糖尿病大鼠海马 CA1 区 t-mTOR 表达无明显变化,锥体细胞胞浆无明显着色,成模后 15 周, t-mTOR 表达增加,胞浆着棕黄色,细颗粒状,成模后 20 周, t-mTOR 表达明显增加,胞浆着棕黄色,粗颗粒状。

5. 与正常对照组比较,成模后 11 周,糖尿病组大鼠海马组织 p-mTOR 和 t-mTOR 的表达差异无统计学意义 ($P>0.05$);成模后 15 及 20 周,糖尿病组大鼠海马组织 p-mTOR 和 t-mTOR 的表达增加,且随病程延长逐渐增加,差异均有统计学意义 (P 均 <0.05)。

结论:

1. STZ 诱导的糖尿病大鼠认知功能障碍随病程延长逐渐加重。
2. STZ 诱导的糖尿病大鼠海马组织凋亡随病程延长逐渐增加。
3. STZ 诱导的糖尿病大鼠海马组织 t-mTOR 免疫组化阳性细胞表达、p-mTOR(Ser2448)及 t-mTOR 蛋白表达随病程延长逐渐增加。

关键词 糖尿病, mTOR, 认知功能障碍, 海马, 凋亡

ABSTRACT

OBJECTIVES

Study the connection of p-mTOR(Ser2448), t-mTOR changes and course of diabetes, diabetic cognitive dysfunction and apoptosis related protein on the diabetic rats induced by STZ(streptozocin, STZ).

METHODS

Male Sprague-Dawley(SD) rats were divided into two groups randomly as follows: diabetic group(DM group) and normal control group(Con group). After adaptive feeding for one week, DM group rats were injected intraperitoneally with STZ(60mg/kg), tail vein blood glucose was measured after 3 days, and established the STZ-induced diabetes models(n=30), the Con group rats were injected with the same amount of citric acid buffer(n=21). After establish the model successfully, fed the equal number of rats for 11 weeks, 15 weeks and 20 weeks. The Morris water maze test detect the cognitive function of rats prior to sacrifice. Blood was collected for measurement of blood glucose and lipids before the animals were decapitated. Left and right hippocampus of 15 diabetes rats and 15 normal rats were preserved by liquid nitrogen, in order to extract the hippocampus protein for taking Western blotting of p-mTOR, t-mTOR, Bax and Bcl-2, rats lefted were perfused with 4% neutral formalin and taken brain, hippocampus from each group were

processed for routine paraffin embedding. Paraffin-embedded sections were cut throughout the tissue and processed with immunohistochemical and TUNEL.

RESULTS

1. Morris water maze test showed that the escape latency and time spend in object quadrant were not significantly different in 11-weeks diabetic rats from those in age-matched control rats($P>0.05$). However, it was significantly different in the 15-weeks and 20-weeks diabetic rats($P<0.05$), the escape latency increased with the diabetes duration and the time spend in object quadrant decreased with the diabetes duration. During all the diabetic groups, the escape latency increased with the diabetes duration($P<0.05$) and the time spend in object quadrant was not. ($P>0.05$).

2. TUNEL showed that the number of pyramidal cells in the hippocampal CA1 region of 15-weeks and 20-weeks diabetic rats were obviously more than the age-matched control rats.

3. Relevant protein expression of apoptosis, Bax, Bcl-2 and Bax/Bcl-2 ratio in hippocampus were not significantly different in 11-weeks diabetic rats from those in age-matched control rats($P>0.05$). However, the expression of Bax and the Bax/Bcl-2 ratio were significantly different in the 15-weeks and 20-weeks diabetic rats from those in age-matched control rats($P<0.05$) since Bcl-2 was not, Bax and

the Bax/Bcl-2 ratio increased with the diabetes duration,

4. Immunohistochemical showed that positive pyramidal cells of t-mTOR in the hippocampal CA1 region were saw in 15-weeks and 20-weeks diabetic rats, but not in age-matched controls.

5. The expression of p-mTOR, t-mTOR in hippocampus were not significantly different in 11-weeks diabetic rats from those in age-matched control rats($P>0.05$). However, the expression were significantly different in the 15-weeks and 20-weeks diabetic rats from those in age-matched control rats($P<0.05$), they increased with the diabetes duration.

CONCLUSIONS

1. With the extension of the course of STZ-induced diabetic rats, the cognitive dysfunction became more and more serious..

2. With the extension of the course of STZ-induced diabetic rats, the number of pyramidal cells and the Bax/Bcl-2 ratio in the hippocampus gradually increased.

3. With the extension of the course of STZ-induced diabetic rats, the expression of p-mTOR(Ser2448) and t-mTOR in the hippocampus gradually increased.

KEY WORDS Diabetes, mTOR, Cognitive dysfunction, Hippocampal, Apoptosis

目 录

摘 要.....	I
ABSTRACT.....	III
缩略词简表.....	VII
第一章 前言.....	1
第二章 材料与方法.....	3
2.1 实验材料.....	3
2.2 实验方法及步骤.....	7
2.3 统计方法.....	14
第三章 实验结果.....	16
3.1 实验动物的一般状况和存活状况.....	16
3.2 大鼠血糖、体重、血脂的比较.....	16
3.3 大鼠认知功能评价.....	18
3.4 大鼠海马组织 tunel 染色结果.....	20
3.5 大鼠海马组织凋亡相关蛋白 Bax 与 Bcl-2 的表达.....	20
3.6 大鼠海马组织 p-mTOR 和 t-mTOR 的表达.....	22
3.7 大鼠海马组织免疫组化结果.....	23
第四章 讨论.....	25
第五章 结论.....	28
参考文献.....	29
综 述.....	31
致 谢.....	41

缩略词简表

DM	Diabetes Mellitus	糖尿病
mTOR	mammalian target of rapamycin	哺乳动物雷帕霉素靶蛋白
STZ	streptozotocin	链脲佐菌素
TNF	tumor necrosis factor	肿瘤坏死因子
SDS	sodium dodecylsulfate	十二烷基磺酸钠
SDS -PAGE	SDS- polyacrylamide gel electrophoresis	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳
TEMED	N, N, N', N'-tetramethyle-thylenediamine	N, N, N', N'-四甲基乙二胺
ECL	electrochemical-luminescence	电化学发光
DAB	Diaminobenzidine	二氨基联苯胺
TC	total cholesterol	总胆固醇
TG	triglyceride	甘油三酯
PI3K	phosphoinositide kinase- related kinase	磷脂酰肌醇激酶相关激酶
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick end labeling	原位末端标记法

第一章 前言

糖尿病 (Diabetes Mellitus, DM) 已经成为肆虐全球的疾病, 我国已经成为糖尿病大国, 糖尿病对于人体的危害主要来自其缓慢而进行性发展的并发症。研究证实, 糖尿病可累及中枢神经系统, 导致认知功能障碍。认知功能包括注意、记忆、计算、时空定向、语言、执行能力、思维及学习能力等等。糖尿病认知功能障碍以获得性认知和行为缺陷为特征^[1], 主要表现为学习、记忆和处理复杂信息的能力降低^[2]。认知功能障碍的程度可由轻度认知功能损害至痴呆。1型糖尿病和2型糖尿病均可出现认知功能损害, 前者主要表现在联想记忆和注意力方面, 后者主要表现在语言和记忆方面, 可能存在记忆提取过程的缺陷^[3]。

糖尿病认知功能障碍 (Diabetic cognitive dysfunction) 的发病机制目前尚未完全阐明。海马是学习和记忆的重要神经中枢, 海马与认知功能关系密切。大量研究表明, 海马神经细胞凋亡是糖尿病认知功能障碍发生的重要原因: 8个月的BB/W鼠存在海马细胞凋亡, 并出现学习记忆损害^[4]; 在1型糖尿病大鼠模型, 随着病程的延长, 大鼠的空间学习能力明显受损, 凋亡的海马神经细胞逐渐增加, 并与认知功能障碍密切相关^[5]。研究提示, 持续的高血糖、大脑缺血、氧化应激、非酶性蛋白糖基化、胰岛素的副作用以及钙离子稳态的改变等均与糖尿病认知功能障碍的发生有关^[6-9], 但具体机制尚不完全明确。

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是一种存在于细胞胞浆中的、在进化上十分保守的丝/苏氨酸蛋白激酶, 是PI3K/Akt信号通路下游的一个效应蛋白, 是雷帕霉素 (rapamycin) 靶分子, 它在细胞生长中处于核心地位, 可以在多种因素的活化下参与基因的转录、蛋白质的翻译起始、核糖体的生物合成、细胞凋亡等多种生物学过程。一方面, mTOR是肿瘤发生过程中的一个重要因子, mTOR信号通路可以调控细胞生长、增殖、细胞周期、细胞迁移等生理过程, 从而与肿瘤等疾病的发生关系密切。另一方面, mTOR信号通路介导多种损伤因素 (如谷氨酸、TNF α 、紫外线照射、鱼藤酮或镉等) 诱导的神经细胞凋亡, 雷帕霉素能够抑制其凋亡^[10-12]。研究表明, 激活的mTOR通路介导AD认知功能障碍的发生与发展, mTOR抑制剂雷帕霉素可明显改善AD的认知功能障碍。

本课题旨在链脲佐菌素（streptozotocin, STZ）诱导的糖尿病大鼠研究其海马组织 mTOR(t-mTOR 和 p-mTOR) 的变化与糖尿病病程、糖尿病认知功能障碍及凋亡相关蛋白的相关性。

第二章 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 主要试剂

STZ	sigma 公司
柠檬酸	湖南洞庭化学有限公司
柠檬酸钠	湖南洞庭化学有限公司
多聚甲醛	天津科密欧化学试剂有限公司
Protease Inhibitor Cocktail	sigma 公司
PMSF	sigma 公司
RIPA 裂解液 (强)	碧云天生物技术研究所
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	碧云天生物技术研究所
Tris	上海鼎国生物
甘氨酸	上海鼎国生物
SDS	上海鼎国生物
Tween-20	上海鼎国生物
脱脂奶粉	伊利牌
甲醇	国药集团化学试剂有限公司
SDS-PAGE 上样缓冲液(5X)	碧云天生物技术研究所
1M Tris-HCL, PH6.8	碧云天生物科技研究所
1M Tris-HCL, PH8.8	碧云天生物科技研究所
30%丙烯酰胺 (29:1)	碧云天生物科技研究所
丽春红染液	碧云天生物技术研究所
蛋白 Marker	Fermentas
PVDF 膜	德国默克公司
t-mTOR 一抗	sigma 公司
p-mTOR (Ser2448)一抗	abcam
Bax 一抗	abcam

Bcl-2 一抗	abcam
Tubulin 抗体	碧云天生物技术研究
辣根过氧化物酶标记山羊抗兔（二抗）	碧云天生物技术研究
辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠（二抗）	碧云天生物技术研究
超敏 ECL 发光试剂盒	碧云天生物技术研究
Western 一抗稀释液	碧云天生物技术研究
Western 二抗稀释液	碧云天生物技术研究
一抗二抗去除液	碧云天生物技术研究
3% H_2O_2 去离子水	中杉金桥
封闭用正常山羊血清	中杉金桥
生物素标记山羊抗兔 IgG	中杉金桥
辣根酶标记链酶卵白素工作液	中杉金桥
DAB	中杉金桥
二甲苯	上海鼎国生物
无水乙醇	上海鼎国生物
苏木素	上海鼎国生物
伊红	上海鼎国生物
中性树脂	上海鼎国生物
蛋白酶 K	上海鼎国生物
凋亡检测试剂盒	美国罗氏

2.1.2 主要仪器

罗氏卓越型血糖仪	美国罗氏
罗氏卓越血糖仪试纸	美国罗氏
Morris 水迷宫	上海欣软信息科技有限公司
分析天平	上海医疗器械八厂
电泳仪和电泳槽	美国伯乐
BIO-RAD Gel Doc XR+ 凝胶成像系统	美国伯乐
高速（冷冻）离心机	德国 eppendorf 公司

摇床	江苏其林贝尔公司
-70 度超低温冰箱	美国 Thermo 公司
塑料薄膜封口机	永康市特力包装机械有限公司
病理石蜡包埋机	沈阳市龙首电子仪器有限公司
石蜡切片机	北京弘泰嘉业科技发展有限公司
电热恒温培养箱	黄石市恒丰医疗器械有限公司
倒置显微镜	Motic
光学显微镜	Olympus 公司
防脱载玻片	天津灏洋生物制品公司
微波炉	格兰仕公司
96 孔板、冻存管、EP 管	美国 Axygen

2.1.3 主要试剂配制方法

4%中性福尔马林溶液:

多聚甲醛	20g
PBS 溶液	500ml (60℃水浴溶解)

10%过硫酸铵 (避光保存):

过硫酸铵	0.5g
ddH ₂ O	5ml

10×电泳液:

Tris	30.3g
甘氨酸	144.0g
SDS	10.0g
ddH ₂ O	定容至 1000ml

10×转膜预备液:

Tris	30.28g
------	--------

甘氨酸	144.88g
ddH ₂ O	定容至 1000ml
1×转膜液:	
10×转膜预备液	80ml
ddH ₂ O	定容至 800ml
甲醇	200ml
10×TBS:	
Tris	60.5g
HCL	~35ml (严格调节 PH 至 7.4)
ddH ₂ O	1000ml
1×TBST:	
10×TBS	100ml
NaCl	8.766g
Tween20	1ml
ddH ₂ O	至 1000ml
封闭液:	
脱脂奶粉	2.5g
1×TBST	50ml
6%分离胶 (7ml):	
ddH ₂ O	2.8ml
30%Acr-Bis (29:1)	1.4ml
1M Tris (PH 8.8)	2.66 ml
10%SDS	70μl
10%过硫酸铵	70μl

TEMED 5.6 μ l

12%分离胶 (8ml):

ddH₂O 1.6ml
30%Acr-Bis (29:1) 3.2ml
1M Tris (PH 8.8) 3.04ml
10%SDS 80 μ l
10%过硫酸铵 80 μ l
TEMED 3.2 μ l

5%浓缩胶 (4ml):

ddH₂O 2.7ml
30%Acr-Bis (29:1) 0.67ml
1M Tris (PH 6.8) 0.5ml
10%SDS 40 μ l
10%过硫酸铵 40 μ l
TEMED 4 μ l

DAB 工作液 (现配现用):

20 \times DAB 5 μ l
3%H₂O₂ 1 μ l
PBS 94 μ l

2.1.4 实验动物

清洁级雄性 SD 大鼠 51 只, 体重 150g 左右, 购于中南大学实验动物学部, 均在动物学部的动物饲养室喂养, 每笼 3 只, 室温(20 \pm 2) $^{\circ}$ C, 普通饲料喂养, 自由进食进水, 12 小时光照周期, 适应性喂养 1 周后全部随机分组。

2.2 实验方法及步骤

2.2.1 T1DM 大鼠模型制作

2.2.1.1 链脲佐菌素溶液配制

首先配置溶解 STZ 所需的柠檬酸缓冲液:称取柠檬酸 2.10g,溶解于 60ml 左右的双蒸水中,用 100ml 的量筒定容到 100ml 配成 A 液;称取柠檬酸三钠 2.94g,溶解于 60ml 左右的双蒸水中,用 100ml 的量筒定容到 100ml 配成 B 液,将 A、B 液按 1:1 的比例混合,用 PH 计调节 PH 至 4.2-4.5,将配好的液体用 0.22 μ m 过滤器过滤除菌,4 $^{\circ}$ C 保存。用柠檬酸缓冲液以 1% 的浓度溶解 STZ,配置成链脲佐菌素溶液,避光 4 $^{\circ}$ C 放置,现配现用,30min 内用完。

2.2.1.2 T1DM 大鼠模型的建立

SD 大鼠适应性喂养一周后,体重约 200g,禁食 12 小时,称重,随机取 21 只作为正常对照组,其余 30 只作为糖尿病组,糖尿病组按 60mg / kg 确定 STZ 的用量,单次腹腔注射 1%STZ 柠檬酸缓冲液,对照组大鼠均注射等容积的柠檬酸缓冲液。3 天后检测大鼠尾静脉血随机血糖,随机血糖>16.7 mmol / l,视为造模成功。

2.2.1.3 实验大鼠分组

建模成功后将正常大鼠随机分为 3 组,每组 7 只,分别饲养 11 周、15 周和 20 周。将注射 STZ 后随机血糖未达 16.7mmol/l,未成模的 3 只大鼠剔除出组后,剩下的 27 只糖尿病大鼠随机分为 3 组,每组 9 只,分别饲养 11 周、15 周和 20 周。当饲养到所需的周次时,正常组和糖尿病组大鼠各取 5 只,先行水迷宫试验,再用于采血和取新鲜海马组织,其余的大鼠用 4%多聚甲醛灌注后取脑行组织病理学检测、免疫组化检测和 tunel 法检测细胞凋亡。

2.2.2 Morris 水迷宫实验

大鼠分别饲养 11 周、15 周、20 周后行 Morris 水迷宫实验。水迷宫主要由圆形水池、摄像装置和电脑系统组成。摄像装置位于水池的正上方,可同步记录大鼠的游泳轨迹。实验前先往水池注水,使水深约 60cm,且水面高出站台面 1.5cm,放入黑色树脂颗粒覆盖整个水面,使大鼠用视觉无法辨认出池内站台的位置,水温控制在 22~25 $^{\circ}$ C,实验连续 5 天,实验过程中若大鼠在 120s 内未能够找到站台,则将其引导至站台,停留 30s,引导其学习和记忆。计算机自动记录游泳轨迹、游出时间及距离。

(1) 定位航行实验(place navigation): 实验连续4天半, 共训练20次, 上午2次, 下午3次, 每次间隔超过30min, 分别从四个不同的象限入水, 入水时大鼠面向池壁。电脑自动记录大鼠从入水至找到平台所用的时间, 即逃避潜伏期(escape latency)。设120s作为最长逃避潜伏期。大鼠每次爬上平台后均让其休息30s, 入水120s仍未能找到平台者, 由试验者用木棒将其引导至平台上休息30s, 同时将其逃避潜伏期记录为120 s。测试结果以逃避潜伏期(S)表示, 作为判断大鼠空间学习能力的指标。

(2) 空间探索实验(spatial probe): 在测试的第5天下午撤走平台, 平台对面的位置作为大鼠入水点, 通过电脑测试系统观察并记录大鼠在2min内停留在原平台所在象限的时间, 以此作为判断其空间记忆能力的指标。逃避潜伏期愈长和原平台所在象限停留的时间越少, 分别表示空间学习能力和空间记忆能力愈弱, 反之, 逃避潜伏期越短, 在原平台所在象限停留时间越长, 表示空间学习能力和记忆能力越强。

2.2.3 大鼠取材

2.2.3.1 取血和新鲜海马组织冻存

大鼠禁食12小时, 用10%水合氯醛, 按0.3ml / 100g体重将大鼠行腹腔麻醉, 仰卧位固定, 用一次性抽血针于心脏进针取血, 留取血液标本做血糖和血脂, 然后迅速剪下大鼠头部放于冰台上, 拨开颅骨, 取出大脑组织并沿正中中线向两边钝性分开大脑皮层, 分别取出左右侧海马, 放液氮速冻后转移至-80度超低温冰箱保存。

2.2.3.2 灌注取脑

大鼠禁食12小时, 用10%水合氯醛, 按0.3ml / 100g体重将大鼠行腹腔麻醉, 仰卧位固定, 沿腹中线剪开腹部, 拎起剑突, 剪开两侧的肋骨, 翻转胸廓, 充分暴露心脏, 将尖端磨钝的输液针刺入左心室, 剪开右心耳, 同时打开输液器, 快速灌注预冷的生理盐水, 待肝脏变白后, 改为4%多聚甲醛灌注固定, 速度先快后慢, 约持续30min, 视大鼠僵直、四肢抽动为满意。灌注完毕, 迅速剪下大鼠头部放于冰袋上, 用镊子向两边拨开颅骨, 取出脑组织, 修剪后迅速放入4%的中性福尔马林溶液中充分固定, 用于常规HE染色、免疫组织化学染色和tunel法检测细胞凋亡。

2.2.4 Western blotting分析海马组织p-mTOR、t-mTOR、Bax、Bcl-2的蛋白表达。

2.2.4.1 组织总蛋白提取

先用液氮预冷研钵，再将海马组织从液氮中取出，称重，放入研钵，迅速研磨，反复加入液氮反复研磨至组织成粉末状，按1:10的比例加入裂解液（含蛋白酶抑制剂混合物），继续研磨，将研钵冰上静置，待解冻后用移液器将液体转移至1.5ml离心管，冰上静置30min，然后4℃下12000rpm离心15min，取上清分装至1.5ml离心管，-20℃保存备用，一部分的分装蛋白于-80℃长期保存。

2.2.4.2 BCA法测蛋白浓度（按碧云天BCA试剂盒说明操作）

- 1) 制备0.5g/ml的蛋白标准-20℃保存备用。
- 2) 制备BCA工作液，取适量的A液和B液按50:1的比例混合。
- 3) 用移液器往96孔板中加入不同浓度梯度的蛋白标准，共8孔，用于描绘标准曲线。
- 4) 往空白孔加入200 μ l稀释了10倍的不同样本的蛋白，每个样本设置2个复孔。
- 5) 每一个加液孔分别加入配好的BCA工作液200 μ l，于37℃恒温箱孵育30min。
- 6) 用酶标仪测定562nm波长下每个加液孔的OD值。
- 7) 用excel表格输入数据后描绘蛋白的标准曲线，并通过标准曲线和样本的平均OD值计算出每个样品的蛋白浓度。

2.2.4.3 蛋白变性

确定各样品每次上样量均为50 μ g，通过测出的样品浓度计算出每次上样的体积A，按A的四分之一倍加入5 \times SDS上样缓冲液，混匀后沸水煮10min，使样品蛋白变性。可成倍变性样品，放-20℃冰箱保存备用。

2.2.4.4 SDS-PAGE方法检测目的蛋白

- 1) 制胶：洗净玻璃板，用制胶架固定，按说明书配制6%分离胶7ml或12%的分离胶8ml，灌胶后用95%的乙醇封胶，静置30min后弃去乙醇，制5%浓缩胶4ml，将浓缩胶灌满玻璃板槽后插入齿梳，严防气泡。将胶静置30-60min后继续下一步实验。
- 2) 上样与电泳：将胶固定于垂直电泳装置中，加入电泳缓冲液后取出尺梳，每孔按50 μ g的质量加入相应体积的变性后的蛋白样品。将电压设为80V后开始电泳，待溴酚蓝染料达分离胶、彩虹marker条带分开时，调压至120V，继续电泳

直至溴酚蓝完全跑出分离胶。

3) 转膜: 准备 6 张与凝胶大小相合的 3mm 滤纸、2 块海绵垫并将其在转膜液中浸泡 15min, 根据 Marker、目的蛋白和内参的分子量适当切割凝胶, 量取并裁剪一块和凝胶大小一致的 PVDF 膜, 将膜于甲醇中浸泡 5min, 阴极板 (黑色) 上放一张海绵垫, 3 张滤纸, 将凝胶置于滤纸上, 用镊子夹取浸泡过甲醇的 PVDF 膜覆盖在凝胶上, 对齐, 避免膜与胶之间产生气泡, 将 3 张滤纸覆盖在 PVDF 膜上, 盖上海绵垫, 将夹层物放入盛有转膜液的装置中, PVDF 膜面朝向阳极, 设置恒定电压 120V, 转移 70 分钟。

4) 封闭: 转膜结束后将 PVDF 膜于 1×TBST 溶液中洗涤 5min, 洗净表面的转膜液后, 放入 5%脱脂奶粉中, 摇床上室温缓慢摇动 2 小时。

5) 抗原抗体反应: 参照说明书的稀释浓度用一抗稀释液稀释一抗 (实验过程中可根据结果调整抗体浓度), 将 PVDF 膜放入干净的杂交袋内, 加入稀释后的一抗, 赶出气泡后将杂交袋封口, 置于 4° C 冰箱内的摇床平缓摇动过夜。第二天回收一抗, 将 PVDF 膜置于装有 1×TBST 的容器中, 水平摇床洗涤 3 次, 每次 10min。洗膜后将膜置于稀释后的二抗溶液中, 水平摇床平缓摇动, 常温孵育 2 小时后, 用 1×TBST 洗膜 3 次, 每次 10min。

6) 显影: 参照超敏 ECL 发光试剂盒说明书进行。取相同体积的 A 液和 B 液, 充分混匀后加到平铺在保鲜膜上的 PVDF 膜上, 用 BIO-RAD 凝胶成像系统显影并将结果保存到电脑中。

2.2.5 海马组织HE染色

石蜡切片常规HE染色

- | | |
|-------------|---------|
| 1) 二甲苯 I | 5-10min |
| 2) 二甲苯 II | 5-10min |
| 3) 无水乙醇 I | 1-3min |
| 4) 无水乙醇 II | 1-3min |
| 5) 95%乙醇 I | 1-3min |
| 6) 95%乙醇 II | 1-3min |
| 7) 80%乙醇 | 1min |
| 8) 蒸馏水 | 1min |

- | | |
|---------------|----------|
| 9) 苏木素染色液 | 1-10min |
| 10) 流水洗去苏木素 | 1min |
| 11) 1%盐酸-乙醇 | 1-2s |
| 12) 流水冲洗 | 10-15min |
| 13) 蒸馏水洗 | 1-2min |
| 14) 0.5%伊红液染色 | 1-3min |
| 15) 蒸馏水稍洗 | 1-2s |
| 16) 80%乙醇 | 1-2s |
| 17) 95%乙醇 I | 2-3min |
| 18) 95%乙醇 II | 2-3min |
| 19) 无水乙醇 I | 3-5min |
| 20) 无水乙醇 II | 3-5min |
| 21) 石炭酸-二甲苯 | 3-5min |
| 22) 二甲苯 I | 3-5min |
| 23) 二甲苯 II | 3-5min |
| 24) 二甲苯 III | 3-5min |
| 25) 中性树胶封固 | |

2.2.6 免疫组化方法检测t-mTOR在糖尿病大鼠海马组织中的表达

- 1) 石蜡切片厚4 μ m, 贴附于防脱处理过的载玻片上, 58 $^{\circ}$ C-60 $^{\circ}$ C烤片过夜。
- 2) 石蜡切片用二甲苯脱蜡, 再依次放入100%、95%、85%、75%、60%的梯度酒精各5min水化, 用双蒸水洗3遍。
- 3) 用0.3%的过氧化氢溶液室温阻断10min, 灭活内源性的过氧化氢酶, 再用双蒸水洗3遍。
- 4) 抗原修复: 采用微波修复。取800ml的0.01M (PH 6.0) 柠檬酸盐缓冲液于容积为1000ml大烧杯内, 微波加热至沸腾, 将组织切片置于玻片架上, 再放入已经沸腾的缓冲液中, 微波炉中高档继续处理10min, 经室温冷却后, 用PBS洗3遍。
- 5) 每张切片加t-mTOR (1:50稀释) 1滴, 抗体需完全覆盖标本, 玻片放于湿盒内, 4 $^{\circ}$ C冰箱过夜。

- 6) 将切片于37℃温箱复温1小时后取出,用PBS洗3次,每次5min,滴加二抗,室温孵育25min,再用PBS洗3次,每次5min。
- 7) 按1:800的浓度配置DAB后滴加至切片标本,显微镜观察染色程度,控制染色反应的时间。
- 8) 用自来水冲洗后,苏木素复染(染核),再盐酸酒精分化,干片后用中性树脂封片,显微镜下观察,拍照。
- 9) 阴性对照:用PBS代替一抗,其余步骤相同。
- 10) 结果判断:用光学显微镜观察,阳性表达定位于胞浆,为海马CA1区锥体细胞胞浆棕黄色着色。胞浆无棕黄着色为阴性。

2.2.7 TUNEL 法检测海马组织神经元凋亡

- 1) 石蜡包埋的组织切片预处理:将组织切片置于染色缸中,用二甲苯洗两次,每次10min。用100%、95%、90%、80%、70%梯度乙醇各浸洗1次,每次8min。用PBS洗5min,加入蛋白酶K溶液(20ug/ml),于室温水解15min,去除组织蛋白。用PBS漂洗3次,每次2min。
- 2) 制备TUNEL反应混合液:将50μl脱氧核糖核苷酸末端转移酶(TdT Enzyme)与450μl荧光素标记的dUTP液(1:9)混匀。
- 3) 玻片干后,处理组加50μl TUNEL反应混合液于标本上(阴性对照组仅加50μl荧光素标记的dUTP液,阳性对照组先加入100μl DNase 1,于15-25℃反应10min),再加盖玻片或封口膜在暗湿盒中反应于37℃温箱反应1h。
- 4) PBS漂洗3次。
- 5) 玻片干后加50μl转化剂-POD(converter-POD)于标本上,加盖玻片或封口膜在暗湿盒中反应于37℃反应30min。
- 6) PBS漂洗3次。
- 7) 在组织处加50-100μlDAB,反应4-8min。
- 8) 滴加双蒸水终止显色。
- 9) 拍照后再用苏木素或甲基绿复染,几秒后立即用自来水冲洗。梯度酒精脱水、二甲苯透明、中性树脂封片。
- 11) 结果判断:用光学显微镜观察海马CA1区锥体细胞情况并拍照。凋亡的阳性表达为胞核棕黄着色,胞核被苏木素染成蓝色、无棕黄着色者为阴性。

2.2.8 一般项目测定

体重：用精确度为 0.01g 的电子天平称取大鼠体重。先将一个大小合适的塑料盒置于电子天平上，将电子天平归零，再将大鼠置于塑料盒内，待其静止不动时称取重量，记下读数，每周同一时间准确测定。

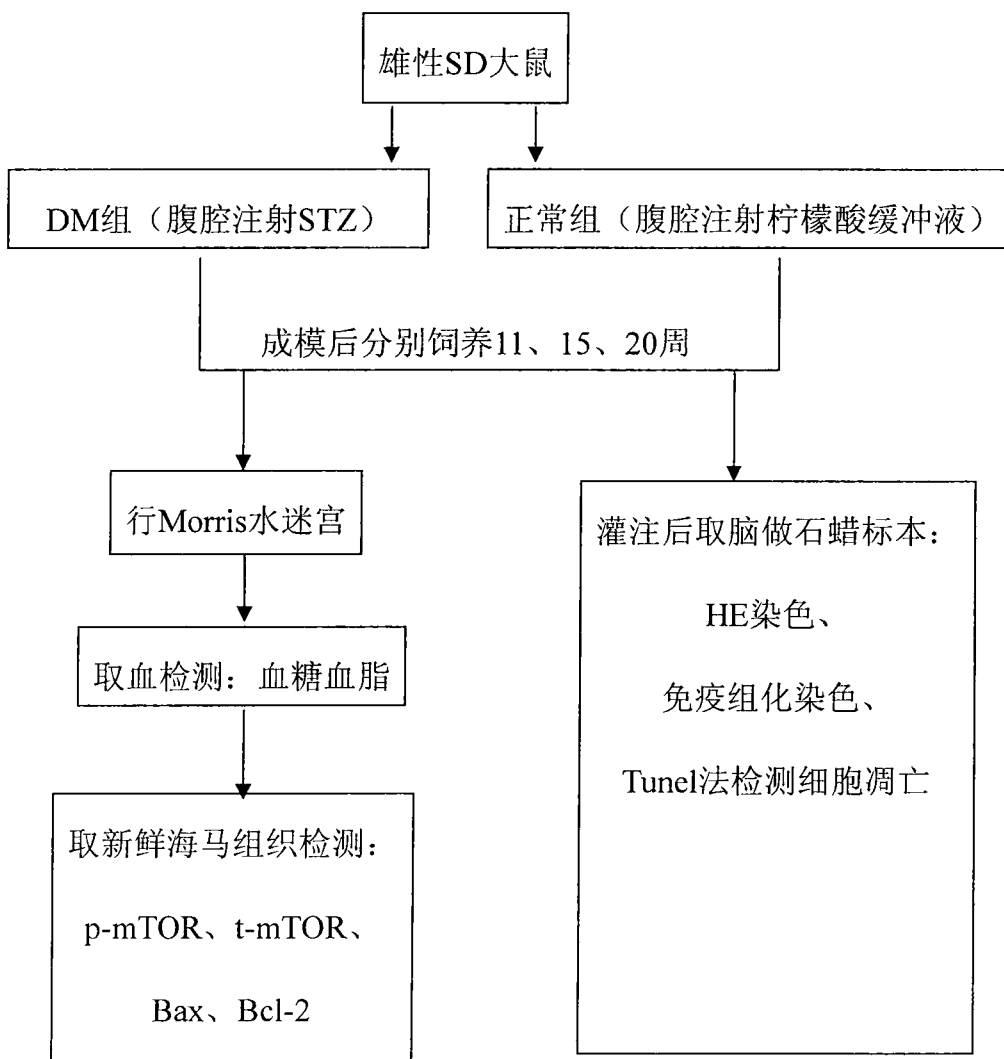
血糖：大鼠造模成功后，每周同一时间于尾部扎针取血检测快速血糖。将大鼠尾巴的局部用干棉签擦干，用 1ml 注射器针头扎针，将第一滴血擦除，再用罗氏卓越血糖仪及试纸检测第二滴血的血糖，然后用棉签蘸取碘伏消毒大鼠尾巴的伤口处。大鼠处死前心脏取血装于专用的血糖管，离心后用机器检测血浆葡萄糖水平。

血脂测定：用 Vitalabselectra E 自动生化分析仪检测血清中的总胆固醇(TC)和甘油三酯(TG)。

2.3 统计方法

用 SPSS17.0 软件进行统计学分析，分析结果以 $\bar{x} \pm s$ （均数±标准差）表示，先对实验数据进行正态检验及方差齐性分析，若数据不成正态分布，则对其进行对数转换后再行统计分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

实验流程图:



第三章 实验结果

3.1 实验动物的一般状况和存活状况

正常对照组大鼠身体状况良好,毛发干燥有光泽、色白,动作灵活,体重持续增长。糖尿病组大鼠成模后出现明显的多饮、多食、多尿,身体状况逐渐变差,毛发成束、潮湿、无光泽、色灰,动作变迟缓,体重增长缓慢。

实验结束时,正常对照组共存活 21 只,糖尿病组共成模 27 只,存活 26 只,饲养 17 周时糖尿病大鼠死亡 1 只,存活率分别为 100%和 96.7%。(表 1)

表 1 两组大鼠存活率比较

生存状态	发生频数(%)	
	糖尿病组	对照组
生存	26(96.67)	21(100.00)
死亡	1(3.33)	0(0.00)

3.2 大鼠血糖、体重、血脂的比较

采用两独立样本 t 检验分别比较糖尿病组与正常对照组大鼠血糖之间的差异,发现造模前,血糖差异无统计学意义 ($t=-0.084, P=0.934$);成模时,血糖差异有统计学意义 ($t=15.187, P<0.001$),糖尿病组较对照组升高;处死时,血糖差异有统计学意义 ($t=11.525, P<0.001$),糖尿病组较对照组升高。(表 2)

表 2 大鼠血糖比较

组别	总例数	血糖(mmol/l)		t	P	判断
		$\bar{X} \pm S$	95%CI			
造模前						
糖尿病组	30	6.87 ± 0.53	6.65, 7.099	-0.084	0.934	差异无统计学意义
对照组	21	6.89 ± 0.43	6.79, 7.21			
成模时						
糖尿病组	27	25.19 ± 4.44	23.21, 27.73	15.187	<0.001	差异有统计学意义
对照组	21	7.04 ± 0.38	6.86, 7.32			
处死时						
糖尿病组	26	31.64 ± 6.15	28.58, 34.69	11.525	<0.001	差异有统计学意义
对照组	21	10.51 ± 1.75	9.40, 11.62			

采用配对 t 检验, 分别比较糖尿病组和正常对照组在造模前后血糖变化, 发现糖尿病组血糖差异有统计学意义 ($t=-19.400, P<0.001$), 造模后较造模前升高; 对照组血糖差异无统计学意义 ($t=-1.092, P=0.295$)。(表 3)

表 3 大鼠血糖的比较

组别	总例数	血糖(mmol/l)		<i>t</i>	<i>P</i>	判断
		$\bar{X} \pm S$	95%CI			
糖尿病组						
造模前	30	6.87 ± 0.53	6.65, 7.099	-19.400	<0.001	差异有统计学意义
成模时	27	25.19 ± 4.44	23.21, 27.73			
对照组						
造模前	21	6.89 ± 0.43	6.79, 7.21	-1.092	0.295	差异无统计学意义
成模时	21	7.04 ± 0.38	6.86, 7.32			

采用两独立样本的 t 检验分别比较 11、15 和 20 三个不同周次糖尿病组和正常对照组之间的体重、甘油三酯 (TG) 和胆固醇 (TC) 的差异, 发现 3 个周次大鼠的糖尿病组和正常组体重差异均有统计学意义 ($p<0.05$), 正常组较糖尿病组高; 20 周大鼠糖尿病组和对照组 TG 差异有统计学意义 ($p<0.05$), 糖尿病组较正常组高; 11 和 15 周大鼠糖尿病组与正常组的 TG 及 3 个周次大鼠糖尿病组与正常组的 TC 差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。(表 4)

表 4 各组大鼠体重、血脂分析 ($\bar{X} \pm S$)

周	组别	例数	体重 (g)	TG (mmol/l)	TC (mmol/l)
	正常组	7	455.17±41.31	0.27±0.19	1.77±0.83
11 周	DM 组	9	350.80±61.62*	0.43±0.23	1.75±0.03
	正常组	7	517.00±64.34	0.45±0.07	1.66±0.32
15 周	DM 组	9	254.00±73.35**	0.75±0.57	1.86±0.56
	正常组	7	448.67±83.58	0.69±0.23	1.93±0.09
20 周	DM 组	8	300.13±38.25**	1.33±0.39*	2.52±0.63

注: 与同周次的正常组比较, ** $p<0.01$, * $p<0.05$ 。

3.3 大鼠认知功能评价 (Morris 水迷宫实验结果)

1、定位航行实验:

定位航行实验显示, 与同周次正常对照组比较, 成模后 11 周, 糖尿病组大鼠逃避潜伏期的差异无统计学意义 ($P>0.05$); 成模后 15 及 20 周, 糖尿病组大鼠逃避潜伏期的差异有统计学意义 ($P<0.05$), 糖尿病组较对照组长。分别比较糖尿病组各周次之间的逃避潜伏期, 发现随着糖尿病病程延长, 逃避潜伏期逐渐变长 ($P<0.05$)。分别比较正常对照组各周次之间的逃避潜伏期, 发现随着糖尿病病程延长, 逃避潜伏期差异无统计学意义 ($P>0.05$)。(图 1-4)

2、空间探索实验:

空间探索实验显示, 原平台所在象限停留的时间与同周次正常对照组比较, 成模后 11 周, 糖尿病组大鼠差异无统计学意义 ($P>0.05$); 成模后 15 及 20 周, 糖尿病组大鼠差异有统计学意义 ($P<0.05$), 原平台所在象限停留的时间较对照组短。分别比较糖尿病组各周次之间的原平台所在象限停留的时间, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。(图 5)

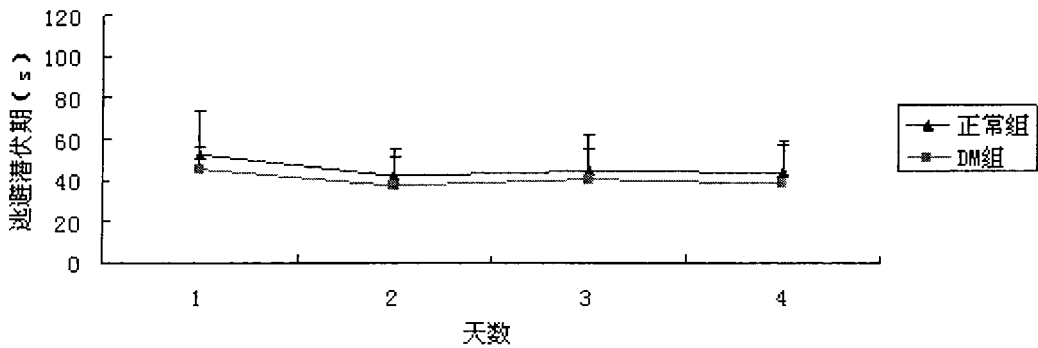


图 1 11 周大鼠定位航行实验分析

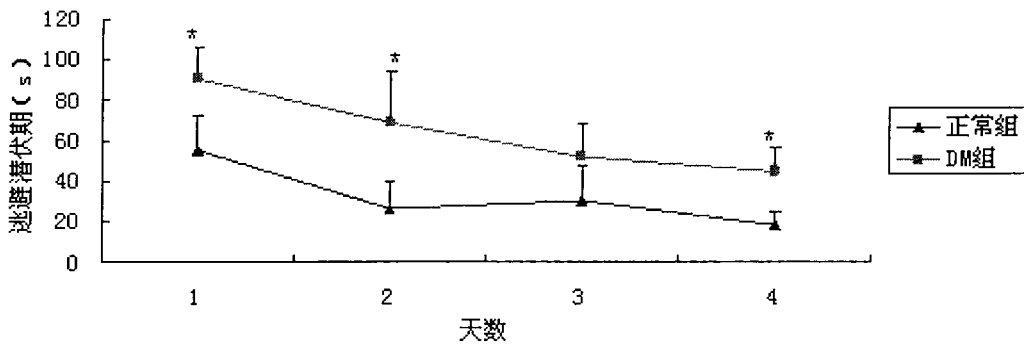


图 2 15 周大鼠定位航行实验分析

注: 与同周次的正常组比较, * $p<0.05$ 。

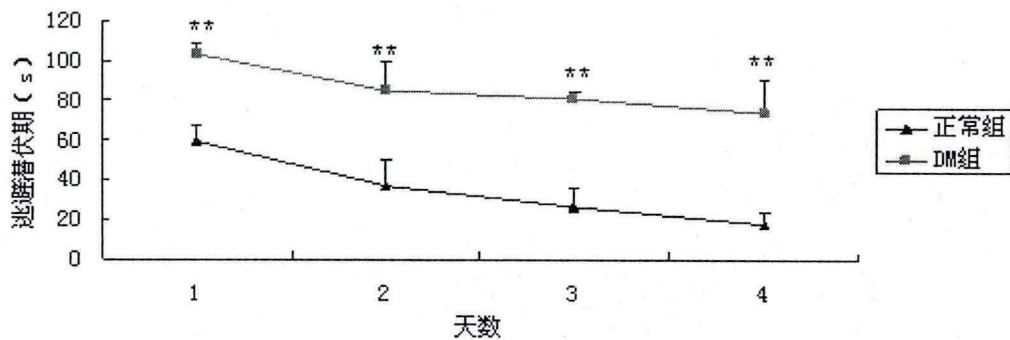


图3 20周大鼠定位航行实验分析
注：与同周次的正常组比较，** $p < 0.01$ 。

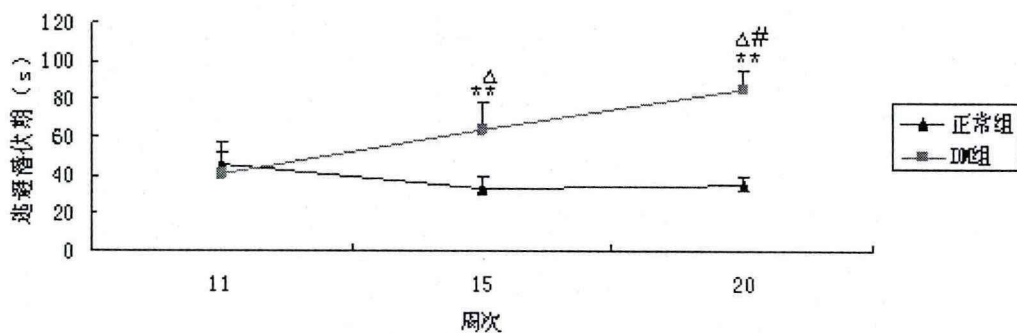


图4 各组大鼠定位航行实验分析
注：与同周次正常组比较，** $p < 0.01$ ；
与11周糖尿病组比较， $\Delta p < 0.05$ ；与15周糖尿病组比较， $\# p < 0.05$ 。

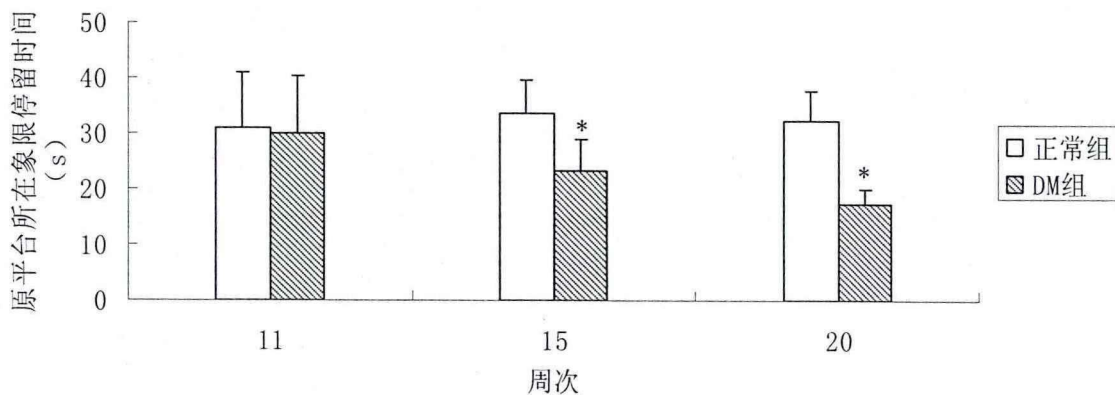


图5 各组大鼠空间探索实验分析
注：与同周次正常组比较，* $p < 0.05$ 。

3.4 大鼠海马组织 tunel 染色结果

光镜下观察大鼠海马组织 tunel 染色, 阳性神经元的细胞核呈棕黄色, 核固缩深染、形态发生改变, 而阴性神经元胞核被苏木素染成蓝色, 无棕黄着色。与同周次正常对照组比较, 成模后 20 周, 糖尿病大鼠海马组织 CA1 区锥体细胞出现明显凋亡, 细胞核呈棕黄着色。(图 6)

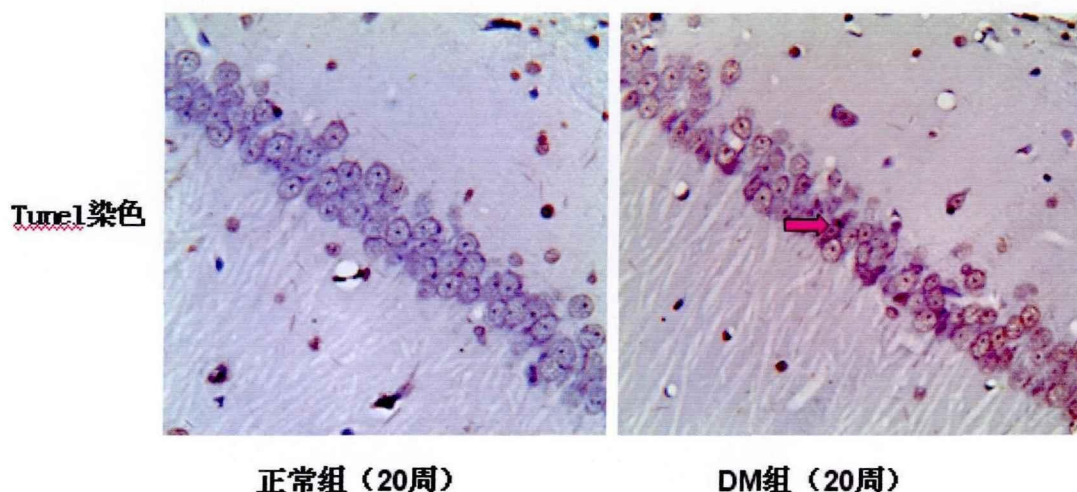


图 6 20 周糖尿病组和对照组大鼠海马细胞凋亡分析

3.5 大鼠海马组织凋亡相关蛋白 Bax 与 Bcl-2 的表达

分别比较各组大鼠海马组织凋亡相关蛋白的差异, 发现与同周次正常对照组比较, 成模后 11 周, 糖尿病组大鼠 Bax、Bcl-2 及 Bax/Bcl-2 比值差异无统计学意义 ($P>0.05$); 成模后 15 及 20, 糖尿病组大鼠抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达差异无统计学意义 ($P>0.05$), 促凋亡蛋白 Bax 及 Bax/Bcl-2 比值的差异有统计学意义 ($P<0.05$), 糖尿病组较正常组表达增加。与 11 周糖尿病组比较, 15 及 20 周糖尿病组大鼠 Bax 及 Bax/Bcl-2 比值的差异有统计学意义 ($P<0.05$), 15 及 20 周组较 11 周组表达增加。与 15 周糖尿病组比较, 20 周糖尿病组 Bax 及 Bax/Bcl-2 比值升高 ($P<0.05$)。(图 7-10)

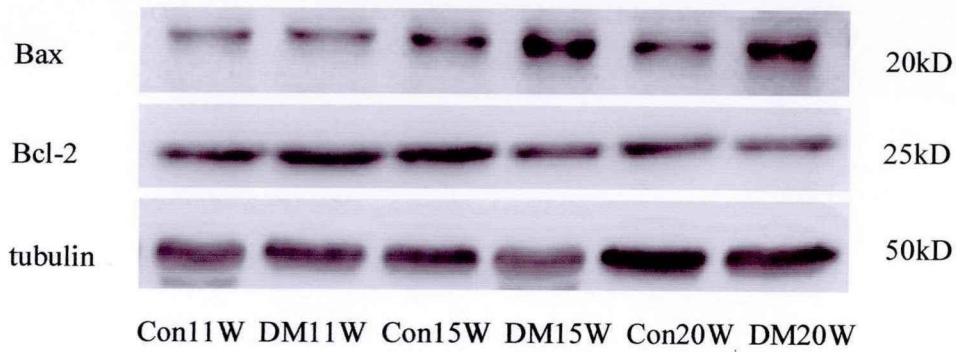


图7 各组大鼠 Bax、Bcl-2 蛋白表达的 Western blotting 电泳图

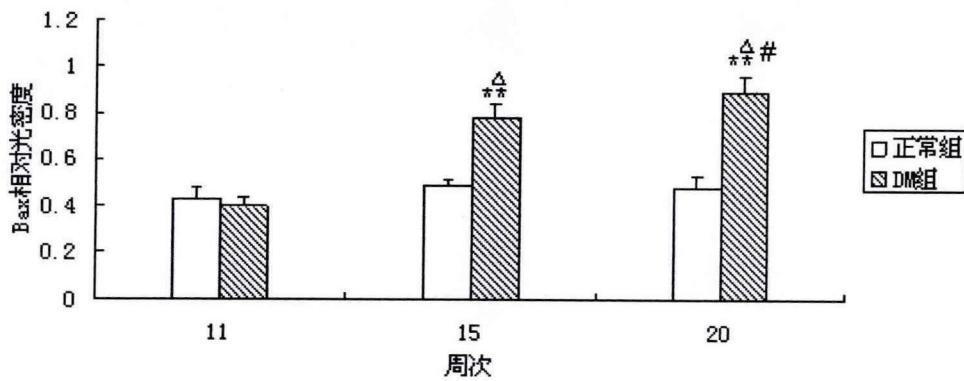


图8 各组大鼠海马组织 Bax 表达分析

注：与同周次正常组比较，**P<0.01。

与11周糖尿病组比较， Δ P<0.01。与15周糖尿病组比较，#p<0.05。

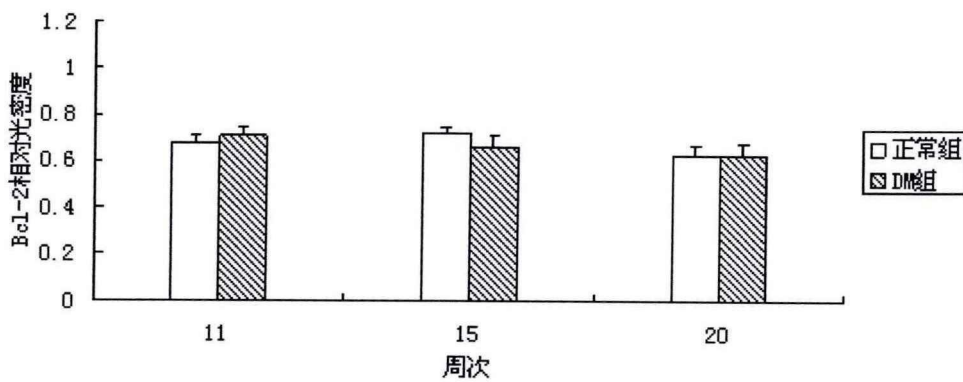


图9 各组大鼠海马组织 Bcl-2 的表达分析

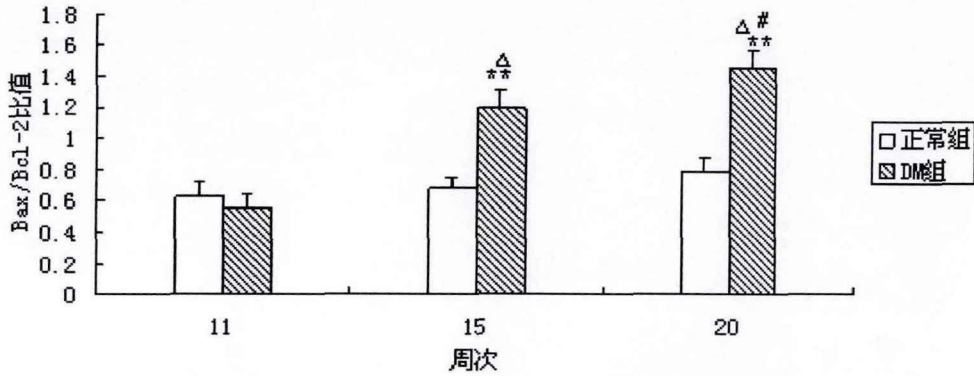


图 10 各组大鼠海马组织 Bax/Bcl-2 分析

注：与同周次正常组比较，**P<0.01。

与 11 周糖尿病组比较， Δ P<0.01。与 15 周糖尿病组比较，#p<0.05。

3.6 大鼠海马组织免疫组化结果

大鼠海马组织 CA1 区 HE 染色显示，正常组大鼠锥体细胞核大而圆，糖尿病组大鼠则出现核固缩现象。大鼠海马组织 CA1 区锥体细胞 t-mOR 免疫组化染色，阳性表达在细胞胞浆，强阳性为棕黄色，粗颗粒状，中阳性为棕黄色，细颗粒状，无明显着色为阴性。结果显示，与同周次正常对照组比较，成模后 11 周，糖尿病大鼠海马 CA1 区锥体细胞 t-mTOR 表达无明显变化，成模后 15 周，t-mTOR 表达增加，成模后 20 周，t-mTOR 表达明显增加。（图 11-12）

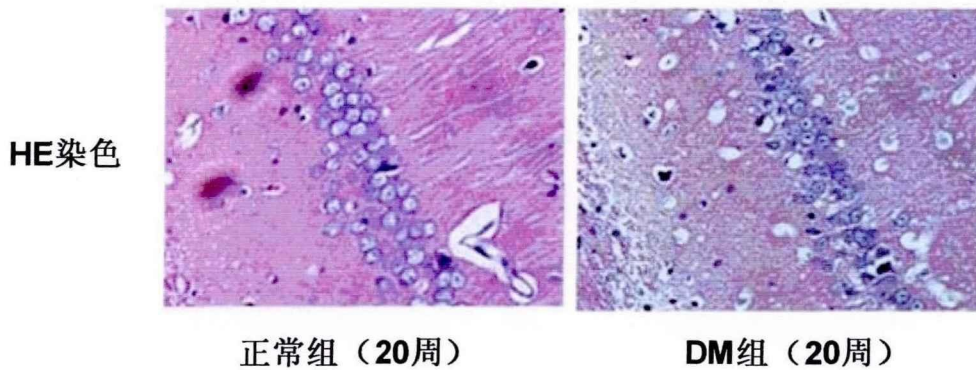


图 11 20 周大鼠海马组织 CA1 区 HE 染色

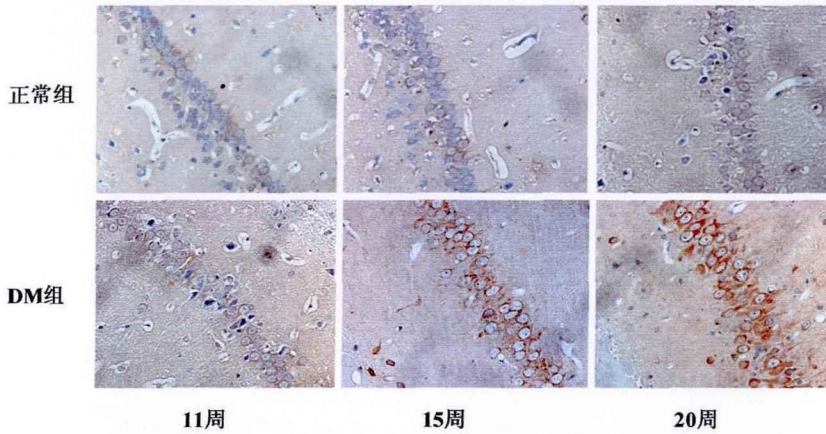


图 12 各组大鼠海马组织 CA1 区 t-mTOR 免疫组织化学染色

3.7 大鼠海马组织 p-mTOR 和 t-mTOR 的表达

分别比较不同周次大鼠糖尿病与对照组之间海马组织 p-mTOR 和 t-mTOR 的表达差异，发现与同周次正常对照组比较，成模后 11 周，糖尿病组大鼠海马组织 p-mTOR 和 t-mTOR 的表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)；成模后 15 及 20 周，糖尿病组大鼠海马组织 p-mTOR 和 t-mTOR 的表达差异有统计学意义 ($P<0.05$)，糖尿病组较正常组表达增加。与 11 周糖尿病组比较，15 及 20 周糖尿病组大鼠海马组织 p-mTOR 和 t-mTOR 的表达差异有统计学意义 ($P<0.05$)，15 及 20 周组较 11 周组表达增加。与 15 周糖尿病组比较，20 周糖尿病组 p-mTOR 和 t-mTOR 表达增加 ($P<0.05$)。(图 13-15)

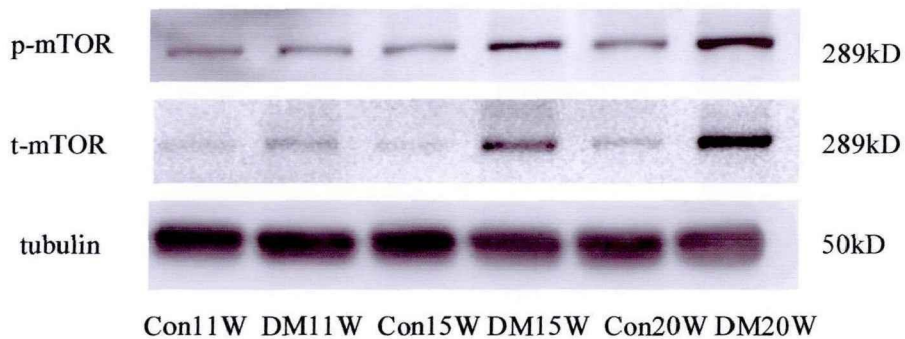


图 13 各组大鼠 p-mTOR、t-mTOR 蛋白表达的 Western blotting 电泳图

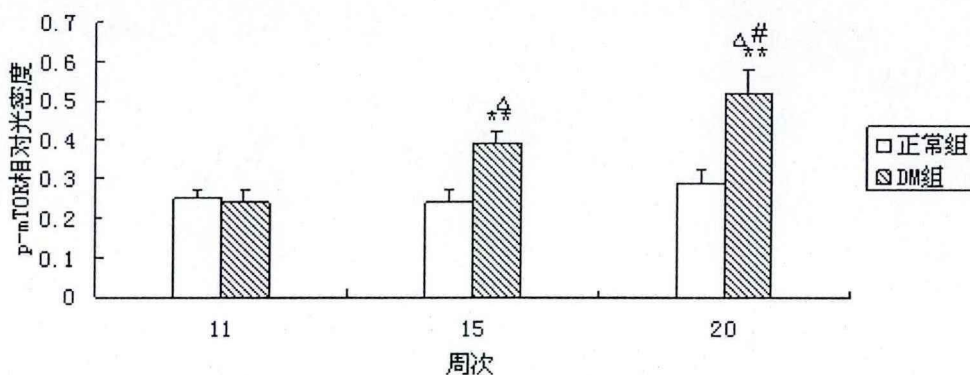


图 14 各组大鼠海马组织 p-mTOR 表达分析

注：与同周次正常组比较，**P<0.01。

与 11 周糖尿病组比较，ΔP<0.01。与 15 周糖尿病组比较，#p<0.05。

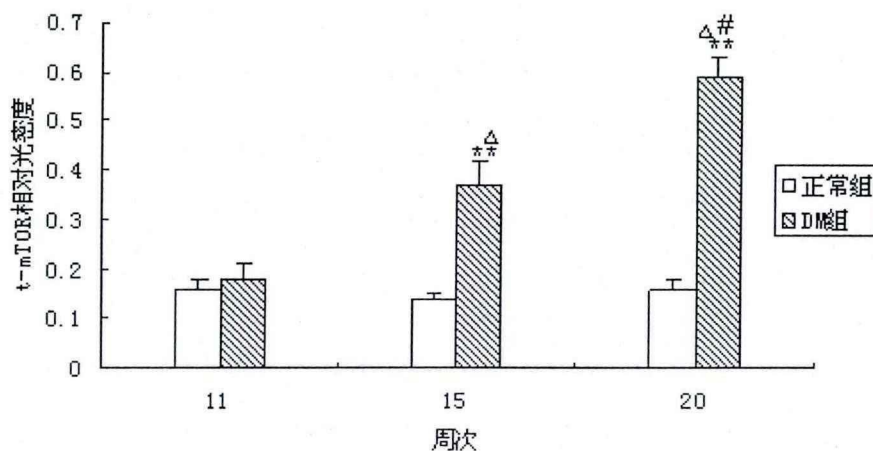


图 15 各组大鼠海马组织 t-mTOR 表达分析

注：与同周次正常组比较，**P<0.01。

与 11 周糖尿病组比较，ΔP<0.01。与 15 周糖尿病组比较，#p<0.05

第四章 讨论

1. 水迷宫实验对糖尿病大鼠认知功能的评价

Morris水迷宫是20世纪80年代初英国心理学家Morris设计的，主要用于测试动物对空间位置觉和方向觉（空间定位）的学习记忆能力^[13]。在啮齿类动物空间学习记忆的实验研究中，它是最好的方法之一。与过去的其他水迷宫和跳台等检测工具相比，它主要的优点是能够提供较多的实验参数，客观地反映实验动物的认知水平，另外，它将动物的学习记忆障碍与感觉、运动缺陷分离开来，减少了后者对于检测的干扰。Morris水迷宫实验主要应用于老年痴呆、血管性痴呆、行为生物学、智力与衰老等方面的研究。通过对该实验所得到的参数进行分析，可以对影响学习记忆的相关药物以及疾病相关模型进行评价。Morris水迷宫实验中，最常用的评价指标是定位航行实验的“逃避潜伏期”^[14]。动物出现认知功能障碍，在Morris水迷宫实验中表现为逃避潜伏期的延长和空间探索实验在原平台所在象限停留的时间减少。

2. 糖尿病认知功能障碍

从神经影像、神经解剖、神经电生理、神经生化以及后来的临床研究均证实，糖尿病患者确切地存在脑组织损伤，有60%-70%的糖尿病患者存在轻、中度的认知功能障碍^[15-16]。糖尿病认知功能障碍是糖尿病的慢性并发症之一，主要是因为糖代谢紊乱损害了中枢神经系统，使得大脑结构和功能发生变化，出现一些相应的临床症状，在许多方面体现出它其实是一个大脑加速老化的过程^[17]。认知功能障碍在1型糖尿病和2型糖尿病均可发生，以获得性的认知和行为缺陷为特征^[2]，主要表现为学习、记忆能力减退和处理复杂信息的能力降低^[3]。研究表明，60岁以下的糖尿病患者以轻度认知功能障碍为主，并不明显影响日常生活和工作，但有流行病学调查显示，对于老年患者，糖尿病使其患老年痴呆的风险增加了2倍。

已经有大量文献报导，注射STZ建造的糖尿病模型鼠会出现认知功能损害，这些糖尿病鼠出现空间学习和记忆的能力下降，在Morris水迷宫实验中表现出

逃避潜伏期延长和空间探索实验在原平台所在象限停留时间减少。本实验用腹腔注射 STZ 成功建造了 1 型糖尿病模型, 通过 Morris 水迷宫实验证实, 随着 STZ 诱导的糖尿病大鼠病程的延长, 大鼠认知功能障碍逐渐加重。

3. 海马神经细胞凋亡与糖尿病认知功能障碍的关系

海马是管理学习、记忆的重要神经中枢, 海马功能与认知功能密切相关, 海马对于空间信息的获取很关键, 对于记忆的巩固和存储也同样重要^[18]。研究发现, 海马突触的可塑性、海马内神经递质和神经调质的变化等均会影响学习和记忆^[19]。近年来大量研究证实, 有认知功能障碍的糖尿病大鼠存在海马神经细胞凋亡。有研究发现, 1 型糖尿病大鼠存在认知功能减退、海马神经元凋亡和凋亡相关基因的高表达, 用褪黑素治疗可以减少海马神经细胞凋亡和凋亡基因的表达, 从而改善认知^[20]。

影响细胞凋亡的蛋白有 Bcl-2、P53、生长因子等, 其中 Bcl-2 家族蛋白是转导凋亡信号的最重要的蛋白, 其分为促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白两大类, 通常, 这两类蛋白的平衡决定了细胞是否发生凋亡。促凋亡蛋白由促进细胞凋亡的一些基因编码, 主要包括 Bax、Bak 等, 它们可以直接与线粒体膜相结合, 促进细胞色素 C 的释放, 促使细胞发生凋亡。抗凋亡蛋白由抑制细胞凋亡的一些基因编码, 主要包括 Bcl-2、Bcl-XL 等, 它们通过稳定线粒体膜, 抑制其释放 caspase、细胞色素 C、凋亡诱导因子等, 抑制细胞发生凋亡。已经证实, Bax 基因的表达直接影响到是否促发细胞凋亡程序, 而 Bcl-2 的表达则可以拮抗 Bax 的促凋亡作用, 阻止细胞自杀^[21], Bax/Bcl-2 比值决定了细胞是否发生凋亡。

本实验证明, 随着糖尿病病程的延长, 糖尿病大鼠海马组织 CA1 区锥体细胞出现明显凋亡, 海马组织中促凋亡蛋白 Bax 表达逐渐增加、抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达无明显变化, Bax/Bcl-2 比值升高, 其变化与糖尿病认知功能障碍的变化相一致。然而, 导致海马神经细胞凋亡的机制尚不完全明了。

4. 糖尿病大鼠海马组织 mTOR 的变化趋势及其与神经细胞凋亡和认知功能障碍的关系

mTOR 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 属于磷脂酰肌醇 3-激酶相关激酶 (PI3K) 蛋白家族成员, 是 PI3K/Akt 信号通路下游的一个蛋白, 广泛参与调控

细胞周期、细胞生长和 DNA 修复等过程。mTOR 具有多种生物学功能, 调控蛋白质合成是其最主要的功能, 另外它还可以加快细胞周期转换, 促进细胞增殖等。mTOR 相关的信号通路有若干条, 其中, PI3K/Akt/mTOR 通路是最主要的一条。配体与受体结合后激活信号分子 PI3K, 进而部分激活 Akt, 后者通过自身催化等途径完全活化后释放到细胞浆, 可以直接磷酸化 mTOR 的 Ser2448 位点激活 mTOR, 激活的 mTOR 再通过磷酸化下游的靶蛋白, 主要是 40S 核糖体蛋白 6S 激酶 (p70S6k) 和真核起始因子 4E 结合蛋白 1 (4E-BP1), 来影响细胞的转录和蛋白翻译等过程, 从而调控细胞的生长、繁殖等。mTOR/p70S6K 信号通路在感受营养信号、调节细胞生长与增殖中起着关键性的作用, 该信号通路的异常激活参与了胰岛素抵抗、糖尿病肾病及视网膜病变的发生与发展。然而, 该信号通路在 DM 脑组织的变化尚未见报道。研究表明, mTOR 通路的异常激活可能介导神经细胞的凋亡, 如: 研究发现, AD 的发生伴随着 mTOR 的上调, mTOR 的上调使 AD 发病过程中的某些蛋白, 如具有神经毒性 Tau 蛋白的表达增加^[22-23], 促使神经细胞凋亡, 参与发病。Majumder^[24]等人证实 mTOR 调控凋亡基因 Bcl-2 和转录因子 HIF-1 α 的表达与功能。mTOR 信号通路还介导多种损伤因素 (如谷氨酸、TNF α 、紫外线照射、鱼藤酮或镉等) 诱导的神经细胞凋亡, 雷帕霉素能抑制其凋亡^[10-12]。基于糖尿病认知功能障碍伴有海马神经元的凋亡及 mTOR 通路的异常激活与神经细胞凋亡相关, 我们推测, mTOR 的异常激活可能参与了糖尿病认知功能障碍的发生与发展。本实验证明, 在 STZ 诱导的糖尿病大鼠, 随着病程的延长, mTOR 表达逐渐增加, 并与 Bax/Bcl-2 比值及认知功能障碍的变化相一致。提示, mTOR 很可能参与了糖尿病认知功能障碍的发生与发展。

第五章 结论

1. STZ 诱导的糖尿病大鼠认知功能障碍随病程延长逐渐加重。
2. STZ 诱导的糖尿病大鼠海马组织凋亡随病程延长逐渐增加。
3. STZ 诱导的糖尿病大鼠海马组织 t-mTOR 免疫组化阳性细胞表达、p-mTOR(Ser2448)及 t-mTOR 蛋白表达随病程延长逐渐增加。

参考文献

- [1] Biessels G, van der Heide LP, Kamal A, et al. Ageing and diabetes: implications for brain function[J]. *Eur J Pharmacol*, 2002, 441(1-2): 1-14.
- [2] 田国庆, 梁晓春. 糖尿病性脑病. *中国康复理论与实践*, 2003,9 (10): 635-636.
- [3] Strachan M W, Frier B M, Deary L J. Type 2 diabetes and cognitive Impairment[J]. *Diabet Med*, 2003, 20(1): 1-2.
- [4] Li ZG, Zhang WX, Grunberger G, et al. Hippocampal neuronal apoptosis in type 1 diabetes[J]. *Brain Research*, 2002, 946(2): 221-231.
- [5] Jafari Anarkooli I, Sankian M, Ahmadpour S, et al. Evaluation of Bcl-2 family gene expression and Caspase-3 activity in hippocampus STZ-induced diabetic rats[J]. *ExpDiabetes Res*. 2008, 2008: 638467.
- [6] Dalal PM, Parab PV. Cerebrovascular disease in type 2 diabetes mellitus[J]. *Neurol India*, 2002, 50(4): 380-385.
- [7] Lassara H, Palace MR. Glycooxidation: the menace of diabetes and aging[J]. *Mt Sinai J Med*, 2003, 70(4): 232-241.
- [8] Gispen WH, Biessels GJ. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus[J]. *Trends Neurosci*, 2000, 23(11): 542-549.
- [9] Biessels G, Gispen WH. The calcium hypothesis of brain aging and neurodegenerative disorders: significance in diabetic neuropathy[J]. *Life Sci*, 1996, 59(5-6): 379-387.
- [10] ChenL, LiuL, LuoY, et al. MAPK and mTOR pathways are involved in cadmium-induced neuronal apoptosis[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2008, 105(1): 251-261.
- [11] Karassek S, Berghaus C, Schwarten M, et al. Ras Homolog Enriched in Brain (Rheb) Enhances Apoptotic Signaling[J]. *The Journal of Biological Chemistry*. 2010, 285(44): 33979-33991.
- [12] Pan T, Rawal P, Wu Y, et al. Rapamycin protects against rotenone-induced apoptosis through autophagy induction[J]. *Neuroscience*, 2009, 164(2):

- 541-551.
- [13] Morris RGM. Spatial localization does not require the presence of local cues[J]. *Learn Motiv*, 1981, 12: 239.
- [14] 陈罗西, 郭玲玲, 李亮. Morris圆形水迷宫的应用及其相关检测指标分析[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2008, 10(8): 55.
- [15] Geert J. Cerebral complications of diabetes: clinical findings and pathogenetic mechanisms[J]. *Neth J Med*, 1999, 54(2): 35-45.
- [16] Allen K V, Frier B M, S trschan M W. The relationship between type 2 diabetes and cognitive dysfunction: longitudinal studies and their methodological limitations[J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 490(1-3): 169-175.
- [17] den Heijer T, Vermeer SE, van Dijk EJ, et al. Type 2 diabetes and atrophy of medial temporal lobe structures on brain MRI[J]. *Diabetologia*, 2003, 46(12): 1604-1610.
- [18] Vasconcellos AP, Zugno AI, Dos Santos AH. Na⁺, K⁺-ATPase activity is reduced in hippocampus of rats submitted to an experimental model of depression: effect of chronic lithium treatment and possible involvement in learning deficits[J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2005, 84(2): 102-110.
- [19] 王盛花. 海马与糖尿病认知功能障碍[J]. *神经解剖学杂志*, 2004, 20(6): 637-640.
- [20] 玉洪荣, 王薇, 郭灵等. 褪黑素对1型糖尿病脑病大鼠学习记忆和海马齿状回细胞凋亡及Bax与Bcl-2蛋白表达的影响[J]. *解剖学研究*, 2009, 31(2): 94-98.
- [21] 陈青, 陈丽. 糖尿病及其慢性并发症与细胞凋亡. 国外医学内分泌学分册 [J], 2001, 21(5): 236-238.
- [22] Li X, Alafuzoff I, Soininen H, et al. Levels of mTOR and its downstream targets 4E-BP1, eEF2, and eEF2 kinase in relationships with tau in Alzheimer's disease brain [J]. *FEBS J*, 2005, 272(16): 4211-4220.
- [23] Khurana V, Lu Y, Steinhilb ML, et al. TOR-mediated cell-cycle activation causes neurodegeneration in a *Drosophila* tauopathy model[J]. *Curr Biol*, 2006, 16(3): 230-241.
- [24] Majumder PK, Febbo PG, Bikoff R, et al. mTOR inhibition reverses Akt-dependent prostate intraepithelial neoplasia through regulation of apoptotic and HIF-1-dependent pathways[J]. *Nat Med*, 2004, 10(6): 594-601.

综述

mTOR 通路 & 认知功能

摘要：哺乳动物雷帕霉素靶蛋白mTOR(mammalian target of rapamycin)是PI3K/Akt通路下游的一个效应蛋白，海马是学习与记忆的重要神经中枢，与认知功能障碍关系密切，研究发现，mTOR通路与海马神经细胞凋亡、自噬和突触的可塑性等等有关，可能介导认知功能障碍的发生。本文就mTOR通路与认知功能的关系作一篇综述。

关键词：mTOR，海马，认知功能障碍

认知功能包括注意、记忆、学习、时空定向、语言的表达、执行能力等，一些神经退行性病变如阿尔茨海默病（Alzheimer's disease, AD）、帕金森氏病（Parkinson's disease, PD）、亨廷顿病（Huntington disease, HD）等都会引起认知功能障碍，另外，脑缺血疾病、糖尿病等也可以引起认知的损害。认知功能障碍的程度分为轻度认知功能障碍（mild cognitive impairment, MCI）至痴呆不等，它与海马的关系密切。海马属于大脑的边缘系统，是一种古皮层结构，位于端脑，它是学习和记忆的重要解剖基础和神经中枢，另外，它还参与注意、情绪、感知觉信息处理和运动等多种生理心理过程的脑调节。海马结构和功能的变化会引起认知功能障碍，但其机制尚未完全阐明。越来越多的研究发现，mTOR通路与海马认知功能障碍有关，但目前为止，其具体机制尚未完全明确。

1 mTOR 与 mTOR 通路

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 mTOR(mammalian target of rapamycin)是一种进化上十分保守的丝/苏氨酸（Ser/Thr）蛋白激酶，是雷帕霉素靶分子，属于磷脂酰肌醇激酶相关激酶（phosphatidylinositol kinase-related kinase, PIKK）蛋白家族成员，mTOR 可以整合能量、营养、生长因子及细胞应激等信号^[1]，通过影响蛋白质合成、基因转录等生物学过程，调节细胞的生长、增殖、凋亡、自噬等^[2]。

mTOR通常以两种复合物的形式存在于细胞内：mTORC1(mTOR complex 1)

和mTORC2(mTOR complex 2)。mTORC1是mTOR与Raptor(regulatory-associated protein of mTOR)结合所形成的复合物,对雷帕霉素敏感,主要参与调控细胞周期和蛋白质合成等。mTORC2是mTOR与Rictor(rapamycin-insensitive companion of mTOR)结合所形成的复合物,对雷帕霉素耐受,主要在构成细胞骨架和细胞存活方面发挥作用。

mTOR上游的信号通路主要有两条,分别为:PI3K/Akt/mTOR通路和LKB1/AMPK/TSC/mTOR通路。当胰岛素、生长因子等与其对应的受体结合后,激活信号分子PI3K,活化的PI3K促进磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸(PIP₂)转化为磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸(PIP₃),继而部分激活Akt,后者通过自我催化等过程完全活化后,可以直接磷酸化mTOR使其活化而发挥调控细胞生长、增殖等作用。另外,Akt还可以通过抑制TSC1/2复合物的活性间接激活mTOR发挥后续效应。肿瘤抑制复合物(tumor scierosis complex, TSC)包括TSC1和TSC2,在哺乳动物中,TSC1/2复合物是mTOR的抑制因子,在此复合物异常的细胞中,mTOR及其下游的靶蛋白被激活,可使细胞不断生长^[3]。缺氧或者能量缺乏时,AMP增加,与AMP活化的蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)结合,活化AMPK,继而磷酸化TSC2,抑制mTOR的激活。

mTOR的下游底物主要包括核糖体6S蛋白激酶(p70 ribosomal protein S6 kinase, p70S6K)和真核起始因子4E结合蛋白1(eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1, 4E-BP1),它们被激活后均可调节翻译的起始。

mTOR最主要的生理功能是调节蛋白质的合成、调控细胞的生长与增值。mTOR能够加快细胞周期G1期-S期的转换,促进细胞增殖;它还可以整合氨基酸、ATP所激发的信号通路,借以调控细胞生长增殖和细胞周期^[4]。研究发现,mTOR通路参与细胞凋亡^[5-6]、细胞自噬^[7-8]、细胞生长与蛋白质合成^[9-10]、免疫^[11]、能量代谢^[12-13]、细胞运动等多种生物学过程。

2 mTOR对认知功能影响的机制

2.1 mTOR与海马神经元凋亡

新近研究表明,阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)、亨廷顿病(HD)等神经退行性疾病,其认知功能障碍与海马神经细胞凋亡和mTOR通路的激活

有关^[14]。在AD的研究中发现,AD的发生伴随着mTOR的上调,mTOR的上调使其发病过程中的某些蛋白,如具有神经毒性Tau蛋白的表达增加^[15-16],促使神经细胞凋亡,参与疾病发生。另外,mTOR信号通路可介导多种损伤因素(如谷氨酸、TNF α 、紫外线照射、鱼藤酮或镉等)诱导的神经细胞凋亡,雷帕霉素能够抑制其凋亡^[17-19]。有研究发现,在慢性镉染毒小鼠模型,mTOR通路被激活,海马CA1区Akt/mTOR通路下游的效应分子p-4EBP1表达浓度依赖性增加,雷帕霉素可通过抑制mTOR和4E-BP1的活化,来抑制镉引起的细胞凋亡^[20],减少镉损伤。近年来大量研究证实,有认知功能障碍的糖尿病大鼠存在海马神经细胞凋亡^[21-23]。有研究发现,糖尿病大鼠存在认知功能减退、海马神经元凋亡和凋亡相关基因的表达变化,用褪黑素治疗可以减少促凋亡基因Bax的表达,增加抗凋亡基因Bcl-2的表达,减少海马神经细胞凋亡,从而改善认知^[24]。

影响细胞凋亡的蛋白有Bcl-2、P53、生长因子等,其中Bcl-2家族蛋白是转导凋亡信号的最重要的蛋白,其分为促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白两大类,通常,这两类蛋白的平衡决定了细胞是否发生凋亡。促凋亡蛋白由促进细胞凋亡的一些基因编码,主要包括Bax、Bak等,它们可以直接与线粒体膜相结合,促进细胞色素C的释放,促使细胞发生凋亡。抗凋亡蛋白由抑制细胞凋亡的一些基因编码,主要包括Bcl-2、Bcl-XL等,它们通过稳定线粒体膜,抑制其释放caspase、细胞色素C、凋亡诱导因子等,抑制细胞发生凋亡。已经证实,Bax基因的表达直接影响到是否促发细胞凋亡程序,而Bcl-2的表达则可以拮抗Bax的促凋亡作用,阻止细胞自杀,Bax/Bcl-2比值决定了细胞是否发生凋亡。

综上,mTOR通路的激活可以增加海马神经元的凋亡,导致认知功能障碍,其机制之一是引起凋亡相关蛋白表达变化,激活了凋亡级联反应;另外,mTOR通路可能通过其下游靶蛋白的激活调节翻译起始,影响某些蛋白如Tau蛋白的表达,引起海马细胞凋亡和认知变化。

2.2 mTOR与海马神经元自噬

自噬是细胞通过溶酶体,主动对自身受损的细胞器和老化的大分子蛋白进行清除的一种方式^[25],调控自噬最主要的途径是PI3K/Akt/mTOR信号途径。当细胞自身稳态发生改变或者机体受到外界的各种刺激(如脑外伤、缺氧缺血等)时自噬便被诱导,细胞可借此途径清除胞体内多余或损伤的细胞器及其他成分。AD、

PD和HD共同的重要的病理特点是 β -淀粉样蛋白(A β)和高度磷酸化的Tau蛋白、 α -synuclein、亨廷顿蛋白(Huntingtin, Htt)分别在脑组织中聚集,其发病均可影响到海马,导致认知功能障碍。mTOR抑制剂雷帕霉素可以通过抑制mTOR,增加细胞自噬,增加病理性蛋白的清除,对神经退行性疾病有治疗作用^[26]。研究发现,在A β 聚集的早期便存在细胞自噬加强,对于细胞损伤有抑制作用。有研究表明,自噬参与了 α -synuclein的降解,雷帕霉素可以通过抑制mTOR,增强细胞自噬,降低 α -synuclein在 α -synuclein转基因小鼠中的表达^[27]。mTOR信号通路可通过改变海马神经细胞自噬来影响疾病所致的认知功能障碍,但其被激活的机制尚未完全明确。

胰岛素和胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor 1, IGF-1)与受体结合后可通过激活PI3K/Akt/mTOR通路来抑制细胞自噬。能量不足时,AMP增加,可通过激活AMPK,抑制mTOR,促进细胞自噬。氨基酸,特别是支链氨基酸的浓度上升可以激活mTOR通路抑制自噬。自噬与mTOR通路有关,细胞自噬可以清除废物,为细胞再生提供一定的能量和合成底物,因此,抑制mTOR增加自噬可能是治疗神经退行性疾病的一个对策。

2.3 mTOR与海马神经元突触的可塑性变化

突触是神经传输和加工的枢纽,突触的可塑性是神经可塑性的最主要形式。突触丢失会导致信息传输中断、神经递质的释放和递质、受体、功能蛋白相互作用丧失,导致神经功能紊乱,甚至痴呆。海马神经元和突触可塑性是学习记忆的神经生物学基础,大量研究表明,突触的可塑性与学习、记忆密切相关。长时程增强(long-term potentiation, LTP)和长时程抑制(long-term depression, LTD)常被用来评价突触的可塑性。

大量的研究表明, mTOR在突触的可塑性变化中起了重要作用。mTOR通过调控其信号通路下游靶蛋白p70S6K和4E-BP1的磷酸化,调节海马突触局部的蛋白质翻译起始,影响突触的可塑性,进而影响海马的认知功能。LTP和LTD都依赖于蛋白质合成,在海马CA1区^[28]和齿状回区^[29]等的研究中均发现, mTOR参与了LTP的维持过程,尤其是对于晚时相的LTP必不可少。同样发现,药物诱导LTD的过程中伴有mTOR的激活和S6K磷酸化增加,抑制mTOR信号通路上游的PI3K

可以降低LTD的幅度^[30]。在实验大鼠中发现,低氧可使神经细胞萎缩、突触减少,使LTP减退,导致学习记忆下降^[31]。在神经退行性疾病中,普遍存在突触可塑性下降,影响海马认知功能,研究新药用来改善突触可塑性,保持突触稳态平衡,影响神经元发生,将是治疗这类疾病的新方向。

2.4 mTOR与海马神经元发育

海马神经元的发育直接影响其功能的行使,研究发现mTOR 通路是神经元发育的重要调控路径。mTOR主要通过以下几个方面来影响神经元发育:1)影响轴突,mTOR 可以通过影响蛋白合成和轴突定向生长来发挥它促生长和导向的作用^[32];2)影响树突,激活 mTOR 可促进树突的生长和分支扩张^[33-34];3)影响突触,mTOR 主要通过影响树突棘的形态和数目来调节突触的形成^[21],树突棘是树突上的功能性突起,是突触后成分,参与构成突触连接。

2.5 mTOR与胰岛素抵抗

胰岛素是调节能量代谢最重要的激素,同时,它还能促进神经元突触形成和多种蛋白质合成,具有神经营养作用。研究发现,胰岛素能够促进遭受损害的胆碱能神经元的功能恢复^[35],从而增强糖尿病大鼠的学习和记忆能力^[36]。胰岛素可以改善认知功能,在保持血糖不变时,用胰岛素治疗,可以明显改善AD患者痴呆量表的评分成绩^[37]。研究证实,胰岛素受体广泛分布于大脑皮层、海马和突触等结构,尤其在海马CA1区等与认知功能相关的区域密集。在糖尿病相关的研究中发现,胰岛素缺乏、胰岛素抵抗和胰岛素-胰岛素受体信号通路异常可能与认知功能障碍相关。

IGF-1 (insulin-like growth factor 1, IGF-1) 是营养因子,它和胰岛素在神经系统中均有抗凋亡的作用^[38-39]。IGF-1、IGF-1R和IR (insulin receptor, IR) 在海马中的表达降低引起细胞凋亡是AD的发病机制之一^[40]。在中枢神经系统中,胰岛素的 α 、 β 亚基可与IGF-1的 α 、 β 亚基结合成混合四聚体,胰岛素与IGF-1均通过激活胰岛素受体底物1 (insulin receptor substrate 1, IRS-1) 发挥生物学效应。IGF-1系统活性降低和胰岛素缺乏被认为可以引起海马神经元凋亡。IGF-1R抗凋亡作用最强的通路主要是PI3K通路,这也是mTOR所存在的一条通路。多项研究

表明, 营养过剩时, 持续性的高糖和高浓度氨基酸可以激活PI3K, 继而使mTOR/S6K1处于持续的激活状态, 高度表达的mTOR/S6K1通过负反馈, 使胰岛素受体底物1 (insulin receptor substrate 1, IRS-1) 过度磷酸化^[41], 从而抑制胰岛素的信号传导, 抑制了Insulin/PI3K/Akt通路, 发生胰岛素抵抗。mTOR激活所致IRS-1过度磷酸化和胰岛素抵抗所致的胰岛素效应减低可使IGF-1和胰岛素在中枢神经系统的生物学功能减退, 影响到人和动物的认知功能。

3 展望

通过多年的研究, 已经对于mTOR通路的组成有了基本了解, 对其与认知功能发生的关系有了初步认识。各类疾病所致严重的认知功能障碍给家庭和社会带来了很大的负担, 但关于治疗却进展不大, 进一步挖掘mTOR和认知功能相关的分子机制, 积极研发合适的靶分子药物是十分必要的, 也具有相当的实用价值。

参考文献

- [1] Pastor MD, Garcia-Yebenes I, Fradejas N, et al. mTOR/S6 kinase pathway contributes to astrocyte survival during ischemia[J]. J Biol Chem, 2009, 284(33): 22067-22078.
- [2] Yang Q, Guan KL. Expanding mTOR signaling[J]. Cell Res, 2007, 17(8): 666-681.
- [3] Potter CJ, Pedraza LG, Xu T. Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2[J]. Nat Cell Biol. 2002 Sep, 4(9): 658-65.
- [4] Shamji AF, Nghiem P, Schreiber SL. Integration of growth factor and nutrient signaling: implications for cancer biology [J]. Mol Cell, 2003 12(2): 271-280.
- [5] 张俊峰等. 雷帕霉素诱导人肝癌细胞BEL27402凋亡中Bcl-2作用研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2006, 13: 1445-1448.
- [6] Kotulska K, Larysz-Brysz M, Grajkowska W, et al. Cardiac rhabdomyomas in

- tuberous sclerosis complex show apoptosis regulation and mTOR pathway abnormalities[J]. *Pediatr Dev Pathol*, 2009, 12(2): 89-95.
- [7] Jung CH, Jun CB, Ro SH, et al. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery[J]. *Mol Biol Cell*, 2009, 20(7): 1992-2003.
- [8] 叶青等. 自噬的分子机制与病理生理意义[J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2007, 27: 358-362.
- [9] Fingar DC, Salama S, Tsou C, et al. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E[J]. *Genes Dev*, 2002, 16(12): 1472-1487
- [10] Jain P, Bhalla US. Signaling logic of activity-triggered dendritic protein synthesis: an mTOR gate but not a feedback switch[J]. *PLoS Comput Biol*, 2009, 5(2): e1000287.
- [11] Weichhart T, Costantino G, Poglitsch M, et al. The TSC-mTOR signaling pathway regulates the innate inflammatory response[J]. *Immunity*, 2008, 29(4): 565-577.
- [12] Zhang C, Yoon MS, Chen J. Amino acid-sensing mTOR signaling is involved in modulation of lipolysis by chronic insulin treatment in adipocytes[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009, 296(4): E862-868.
- [13] Cota D, Proulx K, Smith KA, et al. Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake[J]. *Science*, 2006, 312(5775): 927-930.
- [14] 汝文娟, 唐少君, 钟翎. mTOR信号通路及其与阿尔茨海默病的关系[J]. *中国比较医学杂志*, 2010, 20(8): 70-75.
- [15] Li X, Alafuzoff I, Soininen H, et al. Levels of mTOR and its downstream targets 4E-BP1, eEF2, and eEF2 kinase in relationships with tau in Alzheimer's disease brain [J]. *FEBS J*, 2005, 272(16): 4211-4220.
- [16] Khurana V, Lu Y, Steinhilb ML, et al. TOR-mediated cell-cycle activation causes neurodegeneration in a *Drosophila* tauopathy model[J]. *Curr Biol*, 2006, 16(3): 230-241.
- [17] Chen L, Liu L, Luo Y, et al. MAPK and mTOR pathways are involved in

- cadmium-induced neuronal apoptosis[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2008, 105(1): 251-261.
- [18] Karassek S, Berghaus C, Schwarten M, et al. Ras Homolog Enriched in Brain (Rheb) Enhances Apoptotic Signaling[J]. *The Journal of Biological Chemistry*. Oct 29, 2010, 285(44): 33979-33991.
- [19] Pan T, Rawal P, Wu Y, et al. Rapamycin protects against rotenone-induced apoptosis through autophagy induction[J]. *Neuroscience*, 2009, 164(2): 541-551.
- [20] Mamane Y, Petroulakis E, Rong L, et al. eIF4E from translation to transformation [J]. *Oncogene*, 2004, 23(18) : 3172- 3179.
- [21] Li ZG,Zhang W,Grunberger G,Sima AA.Hippocampal neuronal apoptosis in type 1 diabetes.*Brain Res*.Aug 16 2002;946(2):221 -231.
- [22] Sima AA, Li ZG. The effect of C-peptide on cognitive dysfunction and Hippocampal apoptosis in type 1 diabetic rats[J]. *Diabetes*. May , 2005, 54 (5): 1497-1505.
- [23] Jafari Anarkooli I, Sankian M, Ahmadpour S, et al. Evaluation of Bcl-2 family gene expression and Caspase-3 activity in hippocampus STZ-induced diabetic rats[J]. *ExpDiabetes Res*. 2008, 2008: 638467.
- [24] 玉洪荣, 王薇, 郭灵等. 褪黑素对1型糖尿病脑病大鼠学习记忆和海马齿状回细胞凋亡及Bax与Bcl-2蛋白表达的影响[J]. *解剖学研究*, 2009, 31(2): 94-98.
- [25] Rubinszte in DC, Gestwicki JE, Murphy LO, et al. Potential therapeutic applications of autophagy [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6(4): 304- 312.
- [26] Rubinsztein DC. The roles of intracellular protein-degradation pathw ays in neurodegenera tion [J]. *Nature*, 2006, 443(7113): 780- 786.
- [27] Crews L, Spencer B, Desplats P, et al. Selective molecular alterations in the autophagy pathway in patients with Lewy body disease and in modles of alpha-synucleinopathy[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(27): 25009-25013.
- [28] Cammalleri M, Lütjens R, Berton F, et al. Time-restricted role for dendritic activation of the mTOR-p70S6K pathway in the induction of late-phase

- long-term potentiation in the CA1[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(24): 14368-14373.
- [29] Panja D, Dagyte G, Bidinosti M, et al. Novel translational control in Arc-dependent long term potentiation consolidation in vivo[J]. J Biol Chem, 2009, 284(46): 31498-31511.
- [30] Yang P C, Yang C H, Huang C C, et al. Phosphatidylinositol 3 kinase activation is required for stress protocol-induced modification of hippocampal synaptic plasticity[J]. J Biol Chem, 2008, 283(5): 2631-2643.
- [31] 赵霞, 张先钧, 张晓岩等. 亚急性高原低氧大鼠海马神经细胞的电镜研究[J]. 高原医学杂志, 2006, 16 (2) : 59-60.
- [32] Choi YJ, Di Nardo A, Kramvis I, et al. Tuberous sclerosis complex proteins control axon formation[J]. Genes Dev, 2008, 22(18): 2485-2495.
- [33] Jaworski J, Spangler S, Seeburg D P, et al. Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3'-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway[J]. J Neurosci, 2005, 25(49): 11300-11312.
- [34] Kumar V, Zhang MX, Swank MW, et al. Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways[J]. J Neurosci, 2005, 25(49): 11288-11299.
- [35] Furukawa K, Sopher BL, Rydel RE, et al. Increased activity regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain[J]. J Neurochem, 1996, 67(5): 1882-1896.
- [36] Zhang Songyun, Yang Xiaoguang, Zhang Qingjiu, et al. Effect of insulin on changes of nitric oxide synthase(NOS) positive cells in hippocampus of diabetic rats[J]. Basic Medical Sciences and Clinics, 2002, 22(6): 562-565.
- [37] Craft S, Asthana S, Newcomer JW, et al. Enhancement of memory in Alzheimer disease with insulin and somatostatin, but not glucose[J]. Arch Gen Psychiatry. 1999 Dec, 56(12): 1135-1140.
- [38] Russell IW, Feldman EL. Insulin-like growth factor-I prevents apoptosis in sympathetic neurons exposed to high glucose[J]. Horm Metab, 1999, 31(2-3): 90-96.

- [39] Bertrand F, Atfi A, Cadoret A, et al. A role for nuclear factor KB in the antiapoptotic function of insulin[J]. *J Biol Chem*, 2000, 273: 3931-3938.
- [40] Terry BM, Cannon JC, Guong L. Abnormalities in insulin, IGF-I, and corresponding receptor(R) expression in Alzheimer disease[J]. *J Neuropath Exp Neurol*, 2001, 60: 546.
- [41] Um S H, D Alessio D, Thomas G. Nutrient overload, insulin resistance, and ribosomal protein S6 kinase 1, S6K1[J]. *Cell Met*, 2006, 3(6): 393- 402.

致 谢

光阴似箭，岁月如梭。在论文完成之际，三年的研究生生活也即将结束。回首三年的求学历程，所收获的不仅仅是愈加丰厚的知识，更重要的是在阅读、实践中所培养的思维方式、表达能力和广阔视野。很庆幸这些年来我遇到了许多恩师益友，无论在学习上、生活上还是工作上都给予了我无私的帮助和热心的照顾，让我在诸多方面都有所成长。对那些引导我、帮助我、激励我、关心我的人，我心中充满了感激。感恩之情难以用语言表达，谨在此以最朴实的话语致以最崇高的敬意和最诚挚的谢意。

首先要衷心感谢我敬爱的导师吴静教授，三年来对我的学习生活倾注了大量心血。是您教我内分泌学专业知 识，激励我不断进取。课题的精心设计、论文的每一细节的改动都凝聚着您的心血，您高深的学术造诣，严谨的科学态度，都是我今后学习的楷模。在您严谨学风的影响下，我养成了求实的治学态度和踏实的做人原则，使我终生受益。您广博的学识，高尚的人格和对科学的执着追求精神将永远激励我在科学的道路上不断前进。

衷心感谢雷闽湘老师、廖岚老师、钟惠菊老师、陈慧玲老师、张冬梅老师、周敏老师、蒋铁建老师、郭丽娟老师、王敏老师、刘泽灏老师等全体老师在我的临床学习过程中给予的指导和帮助。同时感谢内分泌实验室的孙志香老师及陈昌华老师在试验过程中给予的支持和帮助，感谢内分泌科全体护理人员在临床各个方面提供的帮助。感谢王珊老师，感谢中心实验室的吴丽莎老师、段朝军老师、汤参娥老师及肿瘤研究所的冯湘玲老师及其师弟黄伟、张利华同学等在实验技术上给予的帮助。

衷心感谢罗旻师兄、郭敏、李纯、汶倩、刘玲娇、吴良燕等师姐。你们一直是我学习的榜样，没有你们在研究课题上开诚布公的讨论和各方面的帮助、关心和支持，我不会得到这么快的进步。感谢我的同学吴源陶、郑莹莹、梁艳芳、江盟、刘刚、朱艳、吴贻竟及师妹马金菊、周善磊等在实验过程及生活中给予的帮助。

感谢中南大学湘雅医院三年来对我的辛勤培养。

感谢我的父母、兄长给予我无私的奉献，默默的关怀和细心的照顾，是你们的支持和鼓励使我顺利完成学业。

感谢所有关心我学习、工作和生活的朋友们。