

二甲双胍对阿尔茨海默症模型大鼠认知功能障碍及PI3K/Akt通路的影响

王百乔¹, 林小茹¹, 韩敏¹, 刘煜¹, 唐超玲²

(1. 海南医学院第一附属医院药学部, 海口 570100; 2. 海南医学院第一附属医院基础实验室, 海口 570100)

[摘要] 目的 探讨二甲双胍 (metformin, Met) 对阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD) 大鼠磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K) /蛋白激酶B (protein kinase B, Akt) 通路及认知功能障碍的影响。方法 取SD大鼠50只, 用随机数字表法分为正常组 (Normal组)、AD模型组 (AD组)、Met低剂量 (50 mg/kg) 组、Met中剂量 (100 mg/kg) 组、Met高剂量 (200 mg/kg) 组, 每组10只; 除Normal组外, 其余各组大鼠均在双侧脑室注射10 μ L 链脲霉素 (3 mg/kg) 建立AD模型。造模成功后开始给药, Met组灌胃给予相应剂量的Met溶液, Normal组和AD组灌胃给予等量生理盐水, 各组连续给药14 d, 1次/d。末次给药后用Morris水迷宫试验检测大鼠空间认知功能。处死大鼠, 取海马组织, 用ELISA法检测海马组织中 β -淀粉样蛋白42 (β -amyloid protein 42, A β 42) 与磷酸化Tau蛋白 (p-tau) 含量; 用HE染色法观察海马组织中神经元病理变化; 用免疫组织化学法检测PI3K阳性表达; 用蛋白质印迹法检测海马组织中PI3K、磷酸化Akt (p-Akt)、胰岛素受体底物-1 (insulin receptor substrate-1, IRS-1)、糖原合酶激酶-3 (glycogen synthase kinase-3, GSK-3) 蛋白相对表达水平。结果 与Normal组相比, AD组大鼠海马可见神经元细胞排列紊乱、减少等病理损伤, 大鼠穿越平台次数、原平台象限游泳距离与总距离的比值、游泳时间与总时间的比值均明显减少 ($P < 0.05$), 海马组织中PI3K、p-Akt和IRS-1蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$), 平均逃避潜伏期延长 ($P < 0.05$), 海马组织A β 42及p-tau含量、GSK-3蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$); 与AD组相比, Met低、中、高剂量组大鼠海马组织的病理损伤减轻, 大鼠穿越平台次数、原平台象限游泳距离与总距离的比值、游泳时间与总时间的比值均明显增加 ($P < 0.05$), 海马组织PI3K、p-Akt、IRS-1蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$), 平均逃避潜伏期缩短 ($P < 0.05$), 海马组织A β 42及p-tau含量、GSK-3蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$), 且Met各剂量组上述指标呈剂量依赖性。结论 Met可激活AD大鼠海马组织PI3K/Akt通路, 降低海马组织p-tau、A β 42含量, 改善AD大鼠认知障碍。

[关键词] 二甲双胍; 阿尔茨海默症; 磷脂酰肌醇-3-激酶; 蛋白激酶B; 认知功能障碍; 大鼠
[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)04-0313-08

Effects of Metformin on Cognitive Dysfunction and PI3K/Akt Pathway in Alzheimer's Disease Rats

WANG Baiqiao¹, LIN Xiaoru¹, HAN Min¹, LIU Yu¹, TANG Chaoling²

(1. Department of Pharmacy, First Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou 570100, China;
2. Basic Laboratory, First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570100, China)

Correspondence to: LIU Yu, E-mail: 280093515@qq.com

[基金项目] 海南省自然科学基金青年基金项目(819QN368)

[作者简介] 王百乔(1990—), 女, 学士, 主管药师, 从事药学研究。E-mail: banjo1990@126.com

[通信作者] 刘煜(1985—), 男, 硕士, 副主任药师, 从事药理学研究。E-mail: 280093515@qq.com

[Abstract] Objective To investigate the effects of metformin (Met) on the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) pathway and cognitive dysfunction in Alzheimer's disease (AD) rats. **Methods** Fifty Sprague Dawley rats were selected and divided into the following groups: normal, AD model (AD group), Met low (50 mg/kg), Met medium (100 mg/kg) and Met high (200 mg/kg) according to the random number table method. Each group included 10 rats. With the exception of the normal group, AD models were established by injecting 10 μ L streptozotocin (STZ, 3 mg/kg) into the bilateral ventricles. After the model was successfully established, Met at the corresponding dose was administered by gavage. The normal and AD groups were administered the same amount of normal saline by gavage. The medicine was administered once a day for 14 days. After the last administration, the Morris water maze test was used to detect the spatial cognitive function of rats. The rats were sacrificed, and the hippocampal tissues were collected. The contents of β -amyloid protein 42 (A β 42) and phosphorylated tau protein (p-tau) in hippocampus were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The pathological changes of neurons in hippocampus were observed by HE staining. The detection of PI3K positive expression was performed by immunohistochemistry. Western blots were used to detect the relative expression levels of PI3K, phosphorylated Akt (p-Akt), insulin receptor substrate-1 (IRS-1), and glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) in hippocampus. **Results** Compared with the normal group, there were pathological damages, such as disordered arrangement and decrease of neurons in hippocampus of rats in the AD group. The number of times the platform was crossed, the ratio of swimming distance to the total distance in the original platform quadrant, the ratio of swimming time to the total time, and the protein expressions of PI3K, p-Akt and IRS-1 in hippocampus of the AD group were significantly low ($P < 0.05$). The average escape latency, the contents of A β 42 and p-tau, and the protein expression of GSK-3 in hippocampus were high ($P < 0.05$). Compared with the AD group, the pathological damages of hippocampal tissue in low, medium, and high dose Met rats were alleviated. The number of times the platform was crossed, the ratio of swimming distance to the total distance in the original platform quadrant, the ratio of swimming time to the total time, and the protein expressions of PI3K, p-Akt and IRS-1 in hippocampus of the AD group were significantly high ($P < 0.05$). The average escape latency, the contents of A β 42 and p-tau, and the protein expression of GSK-3 in hippocampus were low ($P < 0.05$). Moreover, the above indexes were dose-dependent in the Met groups. **Conclusion** Met can activate the PI3K/Akt pathway, decrease the levels of p-tau and A β 42 in hippocampus, and improve cognitive impairment in AD rats.

[Key words] Metformin; Alzheimer's disease; Phosphatidylinositol-3-kinase; Protein kinase B; Cognitive dysfunction; Rats

阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD) 又名老年痴呆症, 以老年斑、神经原纤维缠结和神经元缺失为主要病理表现, 是一种复杂的中枢神经系统退行性疾病^[1-2]。随着社会老龄化加重, AD发病率呈逐年升高的趋势, 给家庭和社会都造成了沉重负担^[3]。AD发病机制复杂, 其认知功能障碍发生、发展的机制一直是临床研究的热点和重点问题之一^[4]。

磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 通路可调控细胞生长、增殖、分化及凋亡等多种生理活动^[5]。近年来研究发现, PI3K/Akt

通路参与 AD 神经元凋亡、自噬等多种生理过程^[6]。因此, 研究 AD 病理过程中 PI3K/Akt 通路的调控机制, 具有一定的临床意义。

二甲双胍 (metformin, Met) 是国际公认的人用降糖药^[7]。近临床报告显示, Met 能够通过改善 AD 患者胰岛素抵抗, 改善 AD 患者的认知功能^[8]。但 Met 改善 AD 患者认知功能的具体分子生物学机制还不甚明确。本研究建立 AD 大鼠模型, 探究 Met 对 AD 大鼠认知功能的影响, 以及对 PI3K/Akt 通路的调控作用, 以期阐明 AD 认知功能障碍发生、发展的机制, 并为临床合理用药提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级雄性SD大鼠,体质量为200~220 g,由广东省医学实验动物中心[SCXK(粤)2018-0002]提供。所有大鼠常规饲养于海南药物研究所有限责任公司[SYXK(琼)2019-0007]动物设施。本实验经本院伦理委员会批准(IACUC-20190003)。

1.2 主要试剂及仪器

Met(批号20032322,规格0.25 g×48T)购自江苏苏中药业集团股份有限公司;链脲霉素(streptozotocin, STZ)(货号:sf1446)购自上海士锋生物科技有限公司;苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒(货号G1120)购自北京索莱宝科技有限公司;检测 β -淀粉样蛋白42(β -amyloid 42, A β 42)用ELISA试剂盒(货号E-EL-R1402)购自上海振誉生物科技有限公司;检测磷酸化Tau蛋白(phosphorylated Tau protein, p-tau)用ELISA试剂盒(货号EHJ-ZH1216)购自厦门慧嘉生物科技有限公司;PI3K抗体、磷酸化Akt(p-Akt)抗体、胰岛素受体底物-1(insulin receptor substrate-1, IRS-1)抗体、糖原合酶激酶-3(glycogen synthase kinase-3, GSK-3)抗体(货号分别为ab39307、ab38449、ab40777、ab93926)均购自美国Abcam公司;BCA蛋白定量试剂盒和胰蛋白酶(货号分别为P0768、P0231)均购自美国Pierce公司。

手动轮转式切片机(型号RM2125RTS)购自德国Leica公司;光学显微镜(型号SMZ745)购自日本Nikon公司;蛋白电泳仪(型号1659001)、半干转膜仪(型号Trans-Blot SD)购自美国Bio-Rad公司;凝胶成像仪(型号GIS-500)购自杭州米欧仪器有限公司。

1.3 大鼠AD模型建立及分组给药

取SD大鼠50只,用随机数字表法分为正常组(Normal组)、AD模型组(AD组)、Met低剂量(50 mg/kg)组、Met中剂量(100 mg/kg)组、Met高剂量(200 mg/kg)组,每组10只。除Normal组大鼠脑双侧室注射10 μ L生理盐水

(即0.9%氯化钠溶液)外,其余各组大鼠均参照文献[9],于脑双侧室注射10 μ L的STZ溶液(3 mg/kg)建立AD模型。具体建模操作方法:将大鼠用3%戊巴比妥钠麻醉后,将其头部固定于脑立体定位仪上,剪去局部毛发,碘伏消毒,沿矢状线切开皮肤,将骨膜向两侧推开,暴露颅骨;以前囟点为基准,在前囟后1.0 mm、矢状缝旁开1.5 mm处用骨钻钻孔,利用微量注射泵和10 μ L微量注射器将10 μ L的STZ溶液按3 mg/kg的剂量缓慢注入,注射完毕后留针1 min;以同样方法在大鼠另一侧脑室注射10 μ L STZ溶液,术后间隔2 d再重复注射一次;术野洒青霉素溶液,缝合皮肤,碘伏消毒;术后大鼠分笼饲养,并连续5 d肌内注射庆大霉素3 U/d,以防感染。Normal组除注射生理盐水外,其余操作同模型组。各组大鼠均于术后观察9 d,于第10天开始给药,参照文献[10]用生理盐水将Met配制成5、10和20 mg/mL的溶液,按10 mL/kg的剂量灌胃给予相应质量浓度的Met溶液;Normal组及AD组按10 mL/kg的剂量灌胃给予生理盐水。各给药组连续给药14 d,1次/d。

1.4 大鼠Morris水迷宫行为检测实验

各组大鼠在末次给药后12 h,参照文献[11]进行Morris水迷宫行为检测。首先制作一个直径150 cm、深60 cm、黑色内壁的不锈钢水池,四周带有不同视标并用布帘围绕。将黑色圆形逃生平台(直径14 cm,高29 cm)置于水池第一象限中央,注水后深度超过平台1~2 cm,水温(23 \pm 2) $^{\circ}$ C。水池上方安装有与计算机相连的摄像头,用于记录大鼠游泳轨迹。实验分两部分。(1)定位航行实验:即将大鼠面朝池壁随机从4个象限之一放入水中,记录大鼠找到隐藏在水下的平台的时间,即逃避潜伏期。如果大鼠120 s内未找到平台,则引导其找到平台,并让其在平台上停留10 s。每只大鼠每日训练4次,平均值作为该鼠当日的平均逃避潜伏期。连续训练观察5 d,以第5天数据的平均值进行比较。(2)空间探索实验:定位航行实验结束后24 h,撤去水下平台,随机选2个象限(平台所在的第一象限除外),将大鼠面朝池壁投入池中,并让其自由游泳120 s,统计大鼠穿越原平台位置的次数,计

算在原平台象限内游泳时间占总时间的比值,以及游过路程占总路程的比值。(3)可视平台验证实验:航行实验和空间探索实验结束后,降低水位露出平台,大鼠随机投放后应无困难地游向平台,以排除前两项实验过程中其存在视觉或运动障碍的可能性,证明结果可信。

1.5 大鼠标本采集

各组大鼠在Morris水迷宫行为检测实验结束后第2天,麻醉下心脏灌注PBS,断头。冰块上迅速取出一侧海马组织,并将海马组织浸泡于质量分数为4%的多聚甲醛溶液中固定,备用。然后,迅速取另一侧海马组织,放于冻存管中,并迅速置于液氮罐中速冻,转移至 -80°C 冰箱中保存备用。

1.6 大鼠海马组织HE染色

取经4%多聚甲醛溶液中固定24h的海马组织,用含30%蔗糖的多聚甲醛溶液脱水,行海马组织冷冻切片。取部分切片,根据试剂盒说明书进行HE染色,并在在显微镜下观察海马组织变化。

1.7 免疫组织化学法检测大鼠海马组织中PI3K阳性表达

取16节HE染色实验剩余的海马组织石蜡切片,经二甲苯脱蜡、梯度乙醇溶液水化、过氧化氢灭活、内源性过氧化物酶封闭进行抗原修复后,加入抗PI3K抗体(稀释比例为1:500),置于湿盒内 4°C 孵育过夜。然后按PV6001试剂盒说明书方法滴加羊抗兔二抗溶液,孵育50min后,进行DAB显色、苏木精对比染色、封固。最后用光学显微镜观察,用Image Pro Plus 5.0图像分析系统分析单位面积(1mm^2)阳性染色区的平均吸光度值,以此反映PI3K阳性表达量。

1.8 ELISA法检测海马组织中A β 42、p-tau含量

取 -80°C 保存的海马组织,于 4°C 冰箱解冻后,用组织匀浆器匀浆,再经离心分离后取上清液。用ELISA试剂盒检测A β 42、p-tau含量,具体操作按说明书进行。

1.9 蛋白质印迹法检测海马组织中PI3K、p-Akt、IRS-1和GSK-3蛋白表达

取 -80°C 保存的海马组织,于 4°C 冰箱中解冻后,用组织匀浆器匀浆,离心分离后,取上清

液。用蛋白提取试剂盒提取组织总蛋白,用蛋白定量BCA试剂盒检测总蛋白浓度后,取 $50\mu\text{g}$ 蛋白上样,进行电泳和转膜反应。TBST溶液清洗后,加入5%脱脂牛奶,室温下封闭1h;TBST溶液清洗3次后,加入抗PI3K、p-Akt、IRS-1、GSK-3和 β -actin(内参)抗体[除 β -actin抗体(1:2000)外,稀释比例均为1:1000],于 4°C 摇床室温孵育过夜;TBST振荡漂洗后,加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(稀释比例为1:2000),于 37°C 摇床上室温孵育1h;TBST清洗3次后,采用增强化学发光法显色,以凝胶成像仪观察条带并拍照,并用Image J软件分析各组蛋白的相对表达水平。

1.10 统计学分析

用SPSS 22.0软件对实验数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。2组间比较采用 t 检验;多组间比较采用单因素方差分析,然后进一步行SNK- q 检验;百分率比较采用卡方检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠的空间学习记忆能力

Morris水迷宫行为检测结果显示:与Normal组相比,AD组大鼠平均逃避潜伏期延长($P<0.05$),穿越平台次数减少($P<0.05$),原平台象限游泳距离与总距离的比值、游泳时间与总时间的比值均降低($P<0.05$);与AD组相比,Met低、中、高剂量组大鼠的平均逃避潜伏期缩短($P<0.05$),穿越平台次数增加($P<0.05$),原平台象限游泳距离与总距离的比值、游泳时间与总时间的比值均升高($P<0.05$)。Met各剂量组的上述指标变化均呈剂量依赖性(表1)。

2.2 各组大鼠海马组织的病理损伤情况

HE染色结果(图1)显示:Normal组大鼠海马神经元细胞体积大而圆,细胞核居中,核仁核膜清晰,层次丰富,细胞质着色浅且均匀;与Normal组相比,AD组大鼠海马神经元细胞排列紊乱,数量减少,体积变小且拉长,细胞核固缩且染色较深,胞体收缩,形状呈多角形且极不规则;与AD组相比,Met各剂量组海马神经元细胞排列紊乱、变性等病理损伤逐渐减轻。

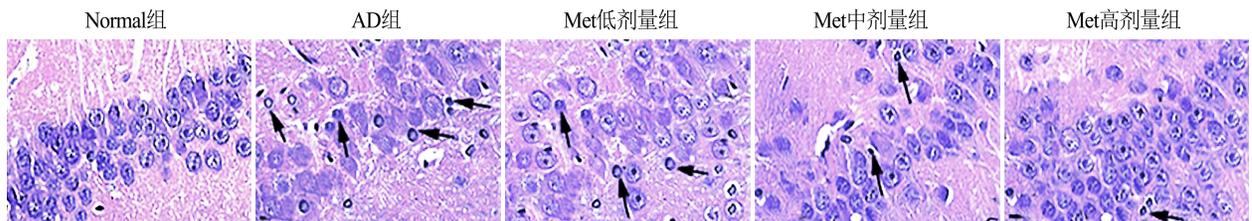
表1 各组大鼠的Morris水迷宫行为指标比较

Table 1 Comparison of behavioral indicators of rats in each group detected by the Morris water maze test

($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	平均逃避潜伏期/s	穿越平台次数/次	原平台象限游泳距离与总距离的比值	原平台象限游泳时间与总时间的比值
Normal	19.00±1.01	4.86±0.49	0.39±0.03	0.40±0.04
AD	32.21±1.64 ^a	1.21±0.31 ^a	0.21±0.01 ^a	0.20±0.02 ^a
Met低剂量	28.85±1.57 ^{ab}	2.85±0.37 ^{ab}	0.27±0.02 ^{ab}	0.28±0.03 ^{ab}
Met中剂量	24.07±1.26 ^{abc}	3.87±0.46 ^{abc}	0.33±0.03 ^{abc}	0.34±0.02 ^{abc}
Met高剂量	20.08±1.68 ^{bcd}	4.68±0.48 ^{bcd}	0.38±0.02 ^{bcd}	0.38±0.03 ^{bcd}

注: Normal指生理盐水对照组, AD指阿尔茨海默症模型组, Met低、中、高剂量指AD建模后分别灌胃给予50 mg/kg、100 mg/kg和200 mg/kg二甲双胍(Met)溶液的用药组。与Normal组相比, ^a $P < 0.05$; 与AD组相比, ^b $P < 0.05$; 与Met低剂量组相比, ^c $P < 0.05$; 与Met中剂量组相比, ^d $P < 0.05$ 。



注: 箭头所示为坏死神经元。

图1 各组大鼠海马组织的HE染色(x400)

Figure 1 HE staining of hippocampus of the rats in each group (x400)

2.3 各组大鼠海马组织中Aβ42、p-tau含量

ELISA法检测结果显示: 与Normal组相比, AD组大鼠的海马组织中Aβ42、p-tau含量升高

($P < 0.05$); 与AD组相比, Met低、中、高剂量组的大鼠海马组织中Aβ42、p-tau含量降低 ($P < 0.05$), 且Met各剂量组上述指标变化呈剂量依赖性(表2)。

表2 各组大鼠海马组织中Aβ42、p-tau含量及PI3K阳性表达量比较

Table 2 Comparison of Aβ 42 and p-tau levels and PI3K positive expression in hippocampus of the rats in each group

($\bar{x} \pm s, n=10$)

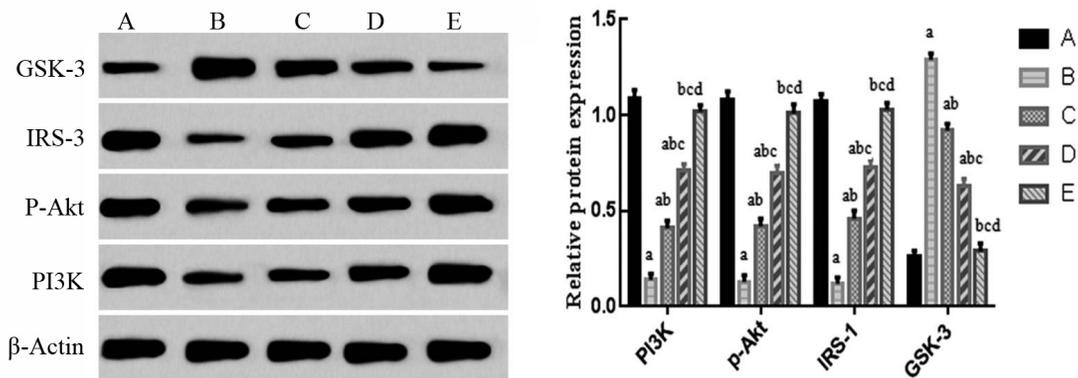
组别	Aβ42 ρ/(ng·L ⁻¹)	p-tau ρ/(ng·L ⁻¹)	PI3K阳性表达/(平均吸光度·mm ²)
Normal	18.02±1.91	16.86±0.49	2.32±0.21
AD	60.21±3.64 ^a	56.21±0.31 ^a	0.51±0.04 ^a
Met低剂量	48.85±2.57 ^{ab}	42.85±0.37 ^{ab}	1.05±0.17 ^{ab}
Met中剂量	39.07±2.26 ^{abc}	30.87±0.46 ^{abc}	1.47±0.16 ^{abc}
Met高剂量	20.08±2.08 ^{bcd}	21.68±0.48 ^{bcd}	1.98±0.18 ^{bcd}

注: Aβ42即β-淀粉样蛋白42, p-tau即磷酸化Tau蛋白。Normal指生理盐水对照组, AD指阿尔茨海默症模型组, Met低、中、高剂量指AD建模后分别灌胃给予50 mg/kg、100 mg/kg和200 mg/kg二甲双胍(Met)溶液的用药组。与Normal组相比, ^a $P < 0.05$; 与AD组相比, ^b $P < 0.05$; 与Met低剂量组相比, ^c $P < 0.05$; 与Met中剂量组相比, ^d $P < 0.05$ 。

2.4 各组大鼠海马组织PI3K、p-Akt、IRS-1和GSK-3蛋白表达

蛋白质印迹法检测结果显示: 与Normal组相比, AD组大鼠海马组织中PI3K、p-Akt、IRS-1蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$), GSK-3蛋

白表达水平升高 ($P < 0.05$); 与AD组相比, Met低、中、高剂量大鼠海马组织中PI3K、p-Akt、IRS-1蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$), GSK-3蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$), 且Met各剂量组上述指标的变化呈剂量依赖性(图2)。



注: PI3K即磷脂酰肌醇-3-激酶, p-Akt即磷酸化蛋白激酶B, IRS-1即胰岛素受体底物-1, GSK-3即糖原合酶激酶-3。A为Normal组, B为AD组, C为Met低剂量组, D为Met中剂量组, E为Met高剂量组。Normal指生理盐水对照组, AD指阿尔茨海默症模型组, Met低、中、高剂量指AD建模后分别灌胃给予50 mg/kg、100 mg/kg和200 mg/kg二甲双胍(Met)溶液的用药组。与Normal组相比, ^a $P < 0.05$; 与AD组相比, ^b $P < 0.05$; 与Met低剂量组相比, ^c $P < 0.05$; 与Met中剂量组相比, ^d $P < 0.05$ 。 $\bar{x} \pm s$, $n=10$ 。

图2 蛋白质印迹法检测各组大鼠海马组织中PI3K、p-Akt、IRS-1、GSK-3蛋白表达水平

Figure 2 Expressions of PI3K, p-Akt, IRS-1, and GSK-3 proteins in hippocampus of the rats in each group were detected by Western blotting

2.5 各组大鼠海马组织中PI3K阳性表达

免疫组织化学法染色结果显示, PI3K可阳性表达于神经元细胞胞质中。与Normal组相比, AD组大鼠海马组织的PI3K阳性表达量降低

($P < 0.05$); 与AD组相比, Met低、中、高剂量组大鼠海马组织中PI3K阳性表达明显升高 ($P < 0.05$), 且Met各剂量组的PI3K表达量呈剂量依赖性(图3)。

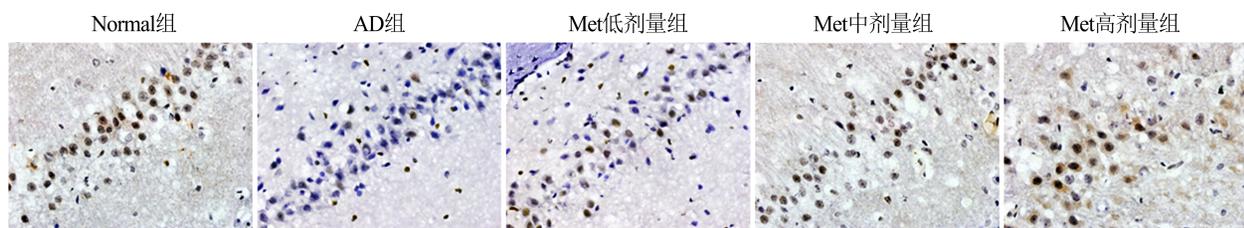


图3 大鼠海马组织PI3K免疫组织化学染色(DAB, ×400)

Figure 3 Immunohistochemical staining of PI3K in hippocampus tissue of the rats (DAB, ×400)

3 讨论

AD的主要临床病理表现为认知功能缺失、学习记忆障碍及语言功能下降等^[12]。侧脑室注射STZ可影响脑内葡萄糖代谢, 引起脑内tau蛋白过度磷酸化以及A β 沉积, 导致海马神经元损伤而损伤学习和记忆功能, 是模拟人类AD脑进行性能量代谢紊乱和认知功能障碍的常用方

法^[13]。本研究采用上述方法建立AD大鼠模型发现, AD模型组大鼠平均逃避潜伏期延长, 穿越平台次数、原平台象限游泳距离与总距离比值、游泳时间与总时间比值减少, 预示其学习记忆功能下降, 脑内A β 42与p-tau含量增多的同时, 海马神经元也出现缺失、减少等病理损伤, 表明建模成功。

目前临床上仍缺乏有效药物来预防、改善或

逆转AD发生^[4]。因此寻找和探索新型、有效的AD预防药物,已成为临床探索研究的重要任务之一。临床报告发现,降糖药Met对AD具有一定的防治作用^[14]。Lu等^[15]发现Met可通过降低胰岛素抵抗,来缓解A β 沉积,改善AD神经功能损伤,并推测Met可能是有应用前途的AD治疗药物。本研究发现, Met低、中、高剂量组大鼠空间学习及记忆功能增加的同时,海马组织神经元缺失、减少等病理损伤明显得到缓解,且Met剂量越高,海马组织中A β 42与p-tau降低越明显,与Lu等^[15]研究结果相一致,证实了Met可能是缓解AD神经元损伤及认知功能下降的潜在药物。但具体分子生物学机制还不明确,仍需继续探究。

大量研究证实PI3K/AKT通路活化,与AD发生发展关系密切。Yao等^[16]发现激活PI3K/AKT通路,可通过抑制GSK-3表达,抑制 γ 分泌酶活性,降低A β 合成,减缓Tau蛋白磷酸化过程而缓解神经损伤。本研究也在AD大鼠脑组织内检测到PI3K、p-AKT蛋白表达的降低及GSK-3表达的升高,提示AD大鼠脑组织PI3K/AKT通路被抑制,GSK-3活化,可能是引起A β 蓄积及神经元损伤的主要原因。另外,IRS-1也与神经元存活和代谢关系密切。但IRS-1与AD的关系还存在争议。Tian等^[17]及刘耀萌等^[18]发现IRS-1在AD大鼠脑组织内表达降低,并认为IRS-1降低,脑内胰岛素信号转导不足而引起糖元转换障碍,脑组织代谢降低,有害物质蓄积,是导致AD神经元损伤及认知功能降低的重要原因,升高IRS-1表达可激活PI3K/AKT通路,改善神经元损伤;而罗俊等^[19]及郝宏铮等^[20]发现IRS-1在AD小鼠脑组织内表达升高,降低IRS-1表达,可促进PI3K/AKT信号通路活化,改善大鼠神经元损伤及认知功能障碍。本研究发现,AD模型组大鼠海马组织中PI3K、p-AKT蛋白表达降低的同时,IRS-1表达也降低,推测大鼠侧脑注射STZ后,海马组织内可能存在胰岛素抵抗和葡萄糖转换障碍,IRS-1表达被抑制,未能激活下游

PI3K/AKT通路,使活性AKT(即p-AKT)减少,不足以抑制GSK-3活性,引起p-tau、A β 42合成增多,而导致AD大鼠认知功能障碍,与文献^[17-18]报告的AD发病机理一致。而Met低、中、高剂量组大鼠海马组织中IRS-1、PI3K、p-AKT蛋白表达升高,GSK-3表达降低,且Met各剂量组上述指标呈剂量依赖性,推测Met改善AD大鼠认知障碍、降低海马组织p-tau、A β 42含量、缓解神经元损伤的作用,可能与PI3K/AKT通路激活有关。

综上所述, Met可激活AD大鼠海马组织PI3K/AKT通路,降低海马组织p-tau、A β 42含量,改善AD大鼠认知障碍,这可能为阐明Met改善AD认知功能障碍的作用,提供一定参考,但PI3K/AKT通路与神经元损伤的关系及机制复杂,本研究未设置通路抑制剂进行验证, Met激活PI3K/AKT通路改善AD认知功能障碍的具体生物学机制仍需继续研究。

参考文献:

- [1] SHINOHARA M, SATO N. The roles of apolipoprotein E, lipids, and glucose in the pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1128: 85-101. DOI:10.1007/978-981-13-3540-2_5.
- [2] OH S B, KIM M S, PARK S, et al. Clusterin contributes to early stage of Alzheimer's disease pathogenesis[J]. *Brain Pathol*, 2019, 29(2): 217-231. DOI:10.1111/bpa.12660.
- [3] KLEIN H U, SCHÄFER M, BENNETT D A, et al. Bayesian integrative analysis of epigenomic and transcriptomic data identifies Alzheimer's disease candidate genes and networks[J]. *PLoS Comput Biol*, 2020, 16(4): e1007771. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1007771.
- [4] 王威丽, 宋沧桑. 阿尔兹海默病发病机制的研究进展及临床用药[J]. *中国药物评价*, 2019, 36(3):204-209. DOI:10.3969/j.issn.2095-3593.2019.03.011.
- [5] JAFARI M, GHADAMI E, DADKHAH T, et al. PI₃K/AKT signaling pathway: Erythropoiesis and beyond[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(3):2373-2385. DOI:10.1002/jcp.27262.
- [6] CHEN W, WU L, HU Y, et al. MicroRNA-107

- ameliorates damage in a cell model of Alzheimer's disease by mediating the FGF7/FGFR2/PI3K/Akt pathway[J]. *J Mol Neurosci*, 2020, 70(10): 1589-1597. DOI:10.1007/s12031-020-01600-0.
- [7] 许晓玲. 二甲双胍对降低2型糖尿病患者阿尔茨海默病发病率的效果分析[J]. *中国当代医药*, 2018, 25(13): 135-137. DOI:10.3969/j.issn.1674-4721.2018.13.042.
- [8] KIM Y G, PARK D G, MOON S Y, et al. Hypoglycemia and dementia risk in older patients with type 2 diabetes mellitus: a propensity-score matched analysis of a population-based cohort study[J]. *Diabetes Metab J*, 2020, 44(1): 125-133. DOI: 10.4093/dmj.2018.0260.
- [9] 李菲, 刘波, 石京山, 等. 金钗石斛总生物碱抑制海马tau蛋白的过度磷酸化[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2019, 33(9): 122-122. DOI: CNKI: SUN: YLBS. 0.2019-09-211.
- [10] 张书, 蔡劲薇, 梁敏. 二甲双胍对SD大鼠骨密度和体成分作用的研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2020, 26(4): 507-510, 523. DOI: 10.3969/j. issn. 1006-7108.2020. 04.008.
- [11] WEI X, XU X, CHEN Z, et al. Protective effects of 2-dodecyl-6-methoxycyclohexa-2, 5-diene-1, 4-dione isolated from *Averrhoa Carambola* L. (Oxalidaceae) roots on neuron apoptosis and memory deficits in Alzheimer's disease[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49(3):1064-1073. DOI:10.1159/000493289.
- [12] HIRA S, SALEEM U, ANWAR F, et al. In silico study and pharmacological evaluation of eplerinone as an anti-Alzheimer's drug in STZ-induced Alzheimer's disease model[J]. *ACS Omega*, 2020, 5(23): 13973-13983. DOI:10.1021/acsomega.0c01381.
- [13] 李银杰, 许璞, 单佳婧, 等. Forskolin与链脲佐菌素诱导的tau蛋白过度磷酸化介导的神经元焦亡在阿尔茨海默病中的机制[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2019, 33(6):442-446. DOI:CNKI:SUN:YLBS.0.2019-06-068.
- [14] PILIPENKO V, NARBUTE K, PUPURE J, et al. Neuroprotective potential of antihyperglycemic drug metformin in streptozocin-induced rat model of sporadic Alzheimer's disease[J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 881:173290. DOI:10.1016/j.ejphar.2020.173290.
- [15] LU X Y, HUANG S, CHEN Q B, et al. Metformin ameliorates A β pathology by insulin-degrading enzyme in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 19(20): 231-251. DOI: 10.1155/2020/2315106.
- [16] YAO Y, WANG Y, KONG L, et al. Osthole decreases tau protein phosphorylation via PI3K/AKT/GSK-3 β signaling pathway in Alzheimer's disease[J]. *Life Sci*, 2019, 217:16-24. DOI:10.1016/j.lfs.2018.11.038.
- [17] TIAN S, JIA W, LU M, et al. Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A ameliorates insulin resistance in neurons by up-regulating IRS-1 expression[J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(52): 20164-20176. DOI:10.1074/jbc.ra119.010809.
- [18] 刘耀萌, 刘钧天, 黄畅, 等. 不同艾灸因素对阿尔茨海默小鼠PI3K/AKT通路及皮质 β 淀粉样蛋白沉淀的影响[J]. *世界中医药*, 2016, 11(8): 1395-1400. DOI: 10.3969/j.issn.1673-7202.2016.08.002.
- [19] 罗俊, 张科楠, 肖帅, 等. 镇心省睡益智方及其精油对AD模型小鼠学习记忆的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(9):74-81.
- [20] 郝宏铮, 王爱平, 王丽, 等. 基于IRS-1/PI3K/Akt通路探讨葛根素对糖尿病大鼠认知功能障碍的保护作用[J]. *中国药师*, 2019, 22(7):1220-1226.
- (收稿日期: 2020-11-09 修回日期: 2021-04-28)