

徐义荣,纪晶晶,张广衡,等.雷帕霉素通过抑制 mTOR 活性降低铝引起的磷酸化 tau 蛋白沉积 [J].中国比较医学杂志,2023,33(8):15-21.

Xu YR, Ji JJ, Zhang GH, et al. Rapamycin reduces p-tau deposition induced by aluminum through mTOR inhibition [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(8): 15-21.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.08.003

# 雷帕霉素通过抑制 mTOR 活性降低铝引起的磷酸化 tau 蛋白沉积

徐义荣<sup>1,2\*</sup>, 纪晶晶<sup>1</sup>, 张广衡<sup>1</sup>, 田晓爱<sup>2</sup>, 卜凡<sup>1</sup>, 张叶平<sup>1</sup>

(1.山西医科大学汾阳学院病理教研室,山西 汾阳 032200;2.山西省汾阳医院病理科,山西 汾阳 032200)

**【摘要】** 目的 研究雷帕霉素是否可以通过抑制 mTOR 活性降低铝暴露引起的 p-tau 蛋白的沉积。方法 24 只 SD 大鼠随机分为四组:对照组、低剂量麦芽酚铝组、中剂量麦芽酚铝组和高剂量麦芽酚铝组。Morris 水迷宫检测大鼠的学习记忆能力;Western blot 检测海马组织中 p-tau 蛋白、p-mTOR 和 PSD95 的变化情况;PC12 细胞分为对照组、铝处理组、铝+溶剂对照组、铝+雷帕霉素 100 nmol 组、铝+雷帕霉素 300 nmol 组和铝+雷帕霉素 500 nmol 组,Western blot 检测蛋白变化情况。12 只大鼠分为铝处理组和铝+雷帕霉素组, Morris 水迷宫检测大鼠的学习记忆能力;Western blot 检测海马组织中 p-tau 蛋白、p-mTOR 和 PSD95 的变化情况。结果 水迷宫实验中,铝处理组大鼠的逃避潜伏期均比对照组延长,中、高剂量麦芽酚铝组逃避潜伏期明显低于对照组((35.24±4.78)、(25.92±8.80) vs (20.32±6.04),  $P<0.001$ );铝处理组大鼠的目标象限停留时间和穿越平台次数均随着铝剂量的升高而减少( $P<0.05$ )。与对照组比较,铝处理组大鼠的海马组织中,p-mTOR/mTOR 和 p-tau/tau 的水平均明显增高( $P<0.05$ );PSD95 蛋白明显降低( $P<0.05$ )。在 PC12 细胞中,与单独铝处理组相比,雷帕霉素干预组的 p-mTOR/mTOR 和 p-tau/tau 的表达均有所减少,尤其在雷帕霉素 300 nmol 和雷帕霉素 500 nmol 干预组中,p-tau 可恢复至正常对照组水平,PSD95 也明显回升( $P<0.05$ )。与单独铝处理组大鼠比较,雷帕霉素干预组的大鼠学习记忆能力明显改善,同时海马组织中 p-mTOR/mTOR 和 p-tau/tau 的表达均减少,PSD95 也明显回升。结论 mTOR 磷酸化激活参与了铝引起的 p-tau 蛋白过度沉积,雷帕霉素可以通过抑制 mTOR 的磷酸化活性降低磷酸化 tau 蛋白的沉积。

**【关键词】** 雷帕霉素;哺乳动物雷帕霉素靶蛋白;铝;磷酸化 tau 蛋白

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 08-0015-07

## Rapamycin reduces p-tau deposition induced by aluminum through mTOR inhibition

XU Yirong<sup>1,2\*</sup>, JI Jingjing<sup>1</sup>, ZHANG Guangheng<sup>1</sup>, TIAN Xiaoi<sup>2</sup>, BU Fan<sup>1</sup>, ZHANG Yeping<sup>1</sup>

(1. Department of Pathology, Shanxi Medical University Fenyang College, Fenyang 032200, China.

2. Department of Pathology, Shanxi Province Fenyang Hospital, Fenyang 032200)

**【Abstract】 Objective** To investigate whether rapamycin reduces deposition of p-tau protein induced by aluminum through mTOR inhibition. **Methods** The study employed four groups of 24 SD rats; control, low dose aluminum maltol (10  $\mu\text{mol/kg Al}(\text{mal})_3$ ), medium dose aluminum maltol (20  $\mu\text{mol/kg Al}(\text{mal})_3$ ), and high dose aluminum maltol (40  $\mu\text{mol/kg Al}(\text{mal})_3$ ), groups. The Morris water maze (MWM) test was used to assess the learning and memory abilities of rats. p-tau, p-mTOR, and PSD95 in the hippocampus were detected by Western blot. PC12 cells were divided into control, aluminum treatment, aluminum+DMSO, aluminum+100 nmol rapamycin, aluminum+300 nmol rapamycin, and

**【基金项目】** 国家自然科学基金青年项目(81803208);山西省高校科技创新项目(2019L0907)。

**【作者简介】** 徐义荣(1981—),女,副教授,硕士生导师,研究方向:阿尔茨海默症的环境因素。E-mail:yirongxu@163.com

aluminum+500 nmol rapamycin groups. Protein expression changes were detected by Western blot. Twelve rats were divided into Al-treated and Al+rapamycin groups, the MWM test was used to assess learning and memory abilities of rats. p-tau, p-mTOR, and PSD95 in the hippocampus were detected by Western blot. **Results** The MWM test showed that the escape latency time of rats in the aluminum-treated group was longer than that in the control group, and that in medium and high dose aluminum mal groups was significantly longer than that in the control group ((35.24±4.78) and (25.92±8.80) vs (20.32±6.04),  $P<0.001$ ). The target quadrant residence time and crossing platform times of rats in Al exposure groups were decreased with the increase in the Al exposure dose ( $P<0.05$ ). Compared with the findings in the control group, in the aluminum-treated group, p-mTOR/mTOR and p-tau/tau levels in the hippocampus of rats were significantly increased ( $P<0.05$ ), and PSD95 was significantly decreased ( $P<0.05$ ). Compared with the findings in the group exposed to aluminum alone, in rapamycin treatment groups, p-mTOR/mTOR and p-tau/tau were decreased, especially in 300 and 500 nmol rapamycin groups, p-tau was restored to the normal level of the control group, and PSD95 was also increased significantly ( $P<0.05$ ). Compared with the findings in Al-treated groups, in Al+rapamycin group, learning and memory abilities of rats were improved, p-mTOR/mTOR and p-tau/tau in the hippocampus of rats were significantly decreased ( $P<0.05$ ), and PSD95 was significantly increased ( $P<0.05$ ). **Conclusions** Activation of mTOR phosphorylation is involved in excessive deposition of p-tau protein induced by aluminum. Rapamycin inhibits p-tau deposition by inhibiting the phosphorylation activity of mTOR.

**[Keywords]** Rapamycin; mTOR; aluminum; p-tau

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

铝 (aluminum, Al) 是一种明确的神经毒物<sup>[1]</sup>, 大量的研究表明铝是阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD) 的重要环境因素<sup>[2]</sup>, 动物实验和职业铝暴露人群调查研究均表明过量的铝暴露可以引起动物和人的认知功能破坏<sup>[3-4]</sup>。但铝引起认知功能损坏的毒性机制并不清楚。

Tau 蛋白是重要的微管结合蛋白, AD 时 tau 蛋白过度磷酸化参与神经元纤维缠结, 严重影响神经元的功能, 而且磷酸化 tau 蛋白过量堆积对神经元也有毒性作用<sup>[5]</sup>。研究表明, 在家族性 AD 患者的脑组织中, 存在铝与磷酸化 tau 蛋白的共定位, 提示铝沉积与 tau 蛋白过度磷酸化有密切的关系<sup>[6]</sup>。雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 参与神经元蛋白合成调节和记忆形成等功能<sup>[7]</sup>, 在 AD 中存在 mTOR 蛋白的过度激活<sup>[8]</sup>。那么作为 AD 的重要环境因素, 铝暴露之后是否可以引起 tau 蛋白过度磷酸化, 以及其 tau 蛋白过度磷酸化是否与 mTOR 的激活相关呢? 本研究采用大鼠亚慢性铝暴露模型和 PC12 细胞研究 mTOR 激活在铝致使 tau 蛋白磷酸化过程中的作用机制, 并使用 mTOR 的抑制剂雷帕霉素进行干预, 研究雷帕霉素是否可以逆转铝的这一毒性。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验动物

SPF 级 8 周龄 SD 雄性大鼠, 体重 180~200 g,

36 只, 来自于中国食品药品检定研究院 [SCXK(京) 2022-0002]。动物实验在中国辐射防护研究院动物实验室进行 [SYXK(晋) 2018-0005], 实验前适应性饲养大鼠 1 周。大鼠食量控制在 25 g/(kg·d), 室温控制在 22~25℃, 湿度控制在 40%~60%。动物实验方案经山西医科大学汾阳学院动物福利伦理委员会批准 (202011), 实验过程按照 3R 原则给予实验动物人道的关怀。

#### 1.1.2 细胞

PC12 (大鼠嗜铬细胞瘤) 细胞由山西医科大学药理学实验室惠赠。

## 1.2 主要试剂与仪器

麦芽酚 (货号: 118-71-8) 和氯化铝 (货号: 7446-70-0) 购自美国 Sigma-aldrich 公司; 雷帕霉素 (rapamycin) (货号: S1039) 购自美国 Selleck 生物科技有限公司; Dulbecco's Modified Eagle 培养基 (DMEM) (货号: 11960044) 购自美国 Gibco Life Technologies 公司; 蛋白酶和磷酸酶抑制剂 (货号: 78441) 购自美国 Thermo Scientific 公司; mTOR 抗体 (货号: GTX101557)、p-mTOR (pser2448) 抗体 (货号: GTX50258)、tau 抗体 (货号: GTX130462) 和 GAPDH 抗体 (货号: GTX627408) 均购自美国 GeneTeX 公司; p-tau (S396) 抗体 (货号: ab109390) 和 p-tau (S404) 抗体 (货号: ab196364) 均购自美国 Abcam 公司; 哺乳动物蛋白抽提试剂盒 (货号: CW0889M)、辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠/兔二

抗(货号: CW2030M/CW2029M)、BCA 蛋白定量试剂盒(货号: CW0014S)均购自北京康为世纪试剂有限公司。Morris 水迷宫系统及视频轨迹跟踪分析系统购自深圳瑞沃德生命科技有限公司;二氧化碳恒温培养箱购自美国 Thermo Fisher 公司;凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad 公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 亚慢性铝暴露 SD 大鼠模型的建立

SD 大鼠随机分为 4 组(每组 6 只):对照组(生理盐水)、低剂量麦芽酚铝组( $10 \mu\text{mol/kg Al}(\text{mal})_3$ )、中剂量麦芽酚铝组( $20 \mu\text{mol/kg Al}(\text{mal})_3$ )和高剂量麦芽酚铝组( $40 \mu\text{mol/kg Al}(\text{mal})_3$ )。Al(mal)<sub>3</sub> 以每隔 1 d 0.1 mL/100 g 的剂量腹腔注射,持续 3 个月。SD 大鼠 12 只,采用  $20 \mu\text{mol/kg}$  麦芽酚铝腹腔注射 2 个月,随后随机分为铝处理组和铝+雷帕霉素干预组,每组 6 只,铝处理组大鼠染铝同时腹腔注射生理盐水 1 个月,铝+雷帕霉素组铝处理的同时采用雷帕霉素  $2 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  腹腔注射 1 个月,结束后进行水迷宫实验,麻醉后取大鼠海马组织进行 Western blot 实验。Al(mal)<sub>3</sub> 溶液按照前期本实验室的配置方法配制<sup>[9-10]</sup>。

#### 1.3.2 细胞培养

PC12 细胞置于高糖 Dulbecco's Modified Eagle 培养基(DMEM)中。添加 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素,置于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中培养。

#### 1.3.3 Morris 水迷宫实验

所有大鼠染毒 3 个月之后进行水迷宫实验,包括连续 5 d 的定位航行实验和 1 d 的空间探索实验。定位航行实验方法如下:在水池的其中一个象限内放置一个水下平台,将大鼠分别从四个象限放入水池中,记录大鼠寻找水下平台的路径和所需时间,即为逃避潜伏期时间,最长 120 s,每天 4 次,连续 5 d。在第 6 天时,移去平台,将大鼠从对面象限放入,自由游泳 60 s。记录大鼠在目标象限停留的时间和穿越平台的次数。使用放置在迷宫上方的摄像机记录每只大鼠的游泳路径。

#### 1.3.4 PC12 细胞染毒方法

雷帕霉素(rapamycin)溶解在 DMSO 中使其浓度为  $1 \text{ mmol}$ ,再用完全培养基稀释浓度分别为  $100 \text{ nmol}$ 、 $300 \text{ nmol}$ 、 $500 \text{ nmol}$  备用。PC12 细胞分为以下 6 组:对照组(control)、铝处理组( $200 \mu\text{mol Al}$

(mal)<sub>3</sub>) (Al treated)、铝+溶剂对照组( $200 \mu\text{mol Al}(\text{mal})_3 + \text{DMSO}$ ) (Al+DMSO)、铝+雷帕霉素  $100 \text{ nmol}$  组( $200 \mu\text{mol Al}(\text{mal})_3 + \text{Rap } 100 \text{ nmol}$ ) (Al+R100 nmol)、铝+雷帕霉素  $300 \text{ nmol}$  组( $200 \mu\text{mol Al}(\text{mal})_3 + \text{Rap } 300 \text{ nmol}$ ) (Al+R300 nmol)、铝+雷帕霉素  $500 \text{ nmol}$  组( $200 \mu\text{mol Al}(\text{mal})_3 + \text{Rap } 500 \text{ nmol}$ ) (Al+R500 nmol)。将 PC12 细胞接种在 6 孔板中,每个组一个 6 孔板,待细胞覆盖率达到 60%~70% 后,DMSO 和雷帕霉素处理 1 h 后再进行  $200 \mu\text{mol Al}(\text{mal})_3$  铝处理 24 h。

#### 1.3.5 免疫印迹(Western blot)实验

水迷宫实验结束后,2% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后处死大鼠,提取大鼠海马组织,采用蛋白抽提试剂盒提取海马组织中的总蛋白和磷酸化蛋白, $-80^\circ\text{C}$  保存待用。细胞实验处理结束后提取细胞的总蛋白和磷酸化蛋白,BCA 蛋白定量。采用 8% 分离胶和 3.9% 的积层胶,上样量为  $60 \mu\text{g}$ ,60 V 电泳 120 min,400 mA 转膜 70 min 转至 PVDF 膜上,5% 的牛奶封闭 2 h, $4^\circ\text{C}$  一抗孵育过夜,一抗浓度分别为 mTOR(1:1000)、p-mTOR(1:500)、tau(1:2000)、p-tau(S396)(1:10 000)、p-tau(S404)(1:5000)、GAPDH(1:3000);二抗孵育,滴加 ECL 化学发光液显影。使用 Quantity One 29.0 版本软件分析各蛋白带的灰度值,用目的条带的灰度值/内参 GAPDH 的灰度值计算各蛋白的相对表达量。

### 1.4 统计学方法

数据以平均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,并使用 SPSS 22.0 软件进行分析。采用重复测量方差分析(ANOVA)分析 Morris 水迷宫逃避潜伏期的组间差异。条带灰度值及其他数据采用单因素方差分析。 $\alpha = 0.05$  为检验水准。GraphPad Prism 8.0 进行图片处理。以  $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 水迷宫实验结果

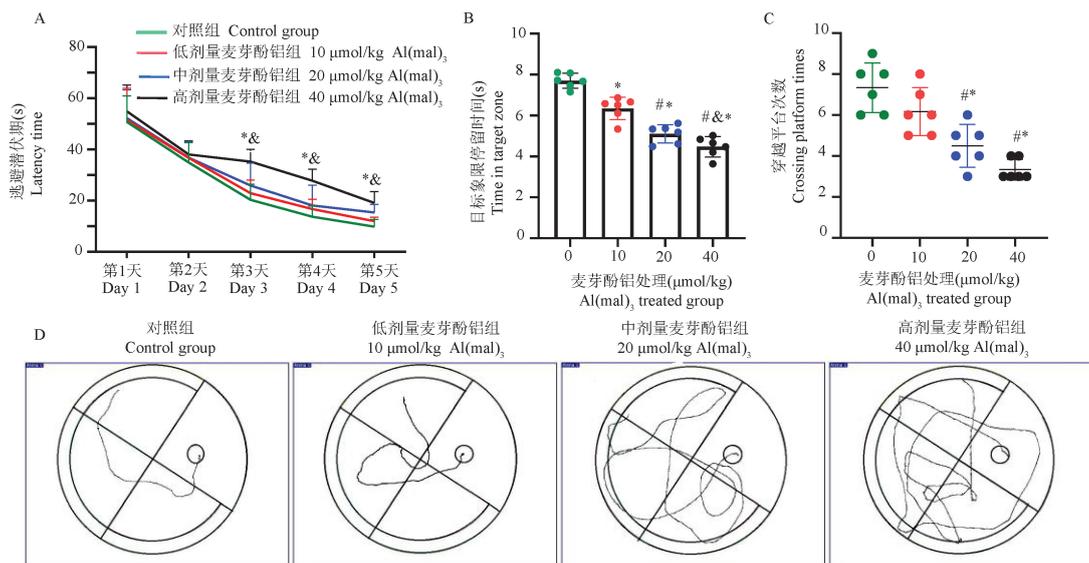
如图 1A 所示,随着训练天数的增加,各组大鼠的逃避潜伏期逐渐减少,在第 3 天、第 4 天和第 5 天,麦芽酚铝处理组大鼠的逃避潜伏期均比对照组大鼠长,中、高剂量麦芽酚铝组逃避潜伏期( $(35.24 \pm 4.78) \text{ s}$ 、 $(25.92 \pm 8.80) \text{ s}$ )明显长于对照组( $(20.32 \pm 6.04) \text{ s}$ ,  $P < 0.001$ ),高剂量麦芽酚铝组的逃避潜伏期( $(35.24 \pm 4.78) \text{ s}$ )长于中剂量麦芽酚

铝组大鼠 ( $25.92 \pm 8.80$  s,  $P < 0.05$ ), 提示麦芽酚铝处理组大鼠的学习能力随着铝剂量增加而明显降低。由图 1B、1C 可见, 在空间探索实验中, 麦芽酚铝处理组大鼠的目标象限停留时间和穿越平台次数均随着铝剂量的升高而减少, 尤其是中剂量和高剂量麦芽酚铝组降低明显。从图 1D 第 5 天的典型轨迹图可见, 中、高剂量麦芽酚铝组大鼠的游泳轨迹与对照组比较, 明显混乱无序。

型轨迹图可见, 中、高剂量麦芽酚铝组大鼠的游泳轨迹与对照组比较, 明显混乱无序。

## 2.2 Tau、mTOR 和 PSD95 蛋白在麦芽酚铝处理大鼠海马组织中的表达情况

如图 2 所示, 与对照组比较, 各麦芽酚铝处理组大鼠的海马组织中, p-mTOR 与总 mTOR 比值 (p-

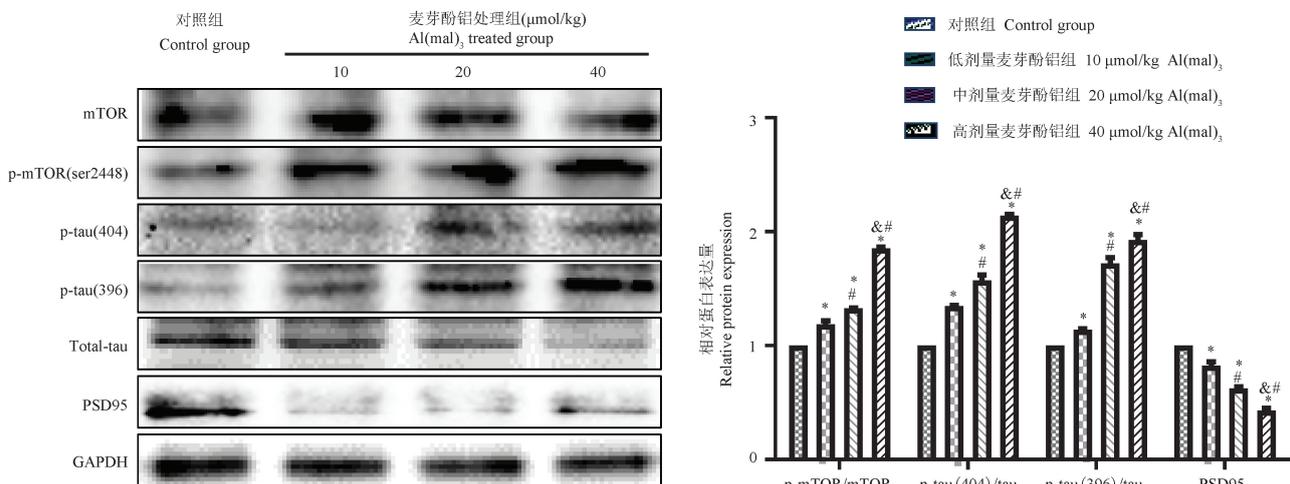


注: A: 各组大鼠连续 5 天的逃避潜伏期时间; B: 各组大鼠的目标象限停留时间; C: 各组大鼠穿越平台次数; D: 第 5 天定位航行实验代表性轨迹图。与对照组相比, \*  $P < 0.05$ ; 与低剂量麦芽酚铝组比较, #  $P < 0.05$ ; 与中剂量麦芽酚铝组比较, &  $P < 0.05$ 。

图 1 水迷宫实验结果 ( $n = 6$ )

Note. A, Escape latency time of rats in each group for 5 consecutive days. B, Target quadrant residence time of rats in each group. C, Crossing the platform times of rats in each group. D, Representative trajectory diagram of the navigation experiment on the 5th day. Compared with control group, \*  $P < 0.05$ . Compared with 10  $\mu\text{mol/kg}$  Al(mal)<sub>3</sub> group, #  $P < 0.05$ . Compared with 20  $\mu\text{mol/kg}$  Al(mal)<sub>3</sub> group, &  $P < 0.05$ .

Figure 1 Morris water maze (MWM) results



注: 与对照组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与低剂量麦芽酚铝组比较, #  $P < 0.05$ ; 与中剂量麦芽酚铝组比较, &  $P < 0.05$ 。

图 2 各组大鼠海马组织中 Western blot 图 ( $n = 6$ )

Note. Compared with control group, \*  $P < 0.05$ . Compared with 10  $\mu\text{mol/kg}$  Al(mal)<sub>3</sub> group, #  $P < 0.05$ . Compared with 20  $\mu\text{mol/kg}$  Al(mal)<sub>3</sub> group, &  $P < 0.05$ .

Figure 2 Western blot results of hippocampal tissue of rats

mTOR/mTOR) 与对照组比较明显增高 ( $P < 0.05$ ); 同时伴随着铝剂量的升高, p-tau/tau 的水平也逐渐增高, 均高于对照组 ( $P < 0.05$ )。而 PSD95 蛋白水平随着麦芽酚铝剂量的增高较对照组明显降低 ( $P < 0.05$ ), 结果表明, 铝暴露可以增加大鼠海马组织中 p-mTOR 和 p-tau 蛋白表达, 降低 PSD95 的表达。

### 2.3 雷帕霉素干预对染铝 PC12 细胞中 p-mTOR、p-tau 和 PSD95 的影响

如图 3 所示, 与对照组相比, 在铝处理组和铝+溶剂对照组, p-mTOR 和 p-tau 的表达均明显增加, 而 PSD95 表达明显下降 ( $P < 0.05$ )。雷帕霉素干预组中, 与单独铝处理组相比, p-mTOR/mTOR 和 p-tau/tau 的表达均有所降低, 尤其在铝+雷帕霉素 300 nmol 组和铝+雷帕霉素 500 nmol 组中, p-tau (s404) 下降明显 ( $P < 0.05$ ), p-tau (s396) 也恢复至接近正常对照组水平。而且随着雷帕霉素干预的剂量增加, PSD95 表达与单独铝处理组比较, 明显回升, 差异显著 ( $P < 0.05$ )。

### 2.4 雷帕霉素干预对大鼠学习记忆能力和海马组织中 p-mTOR、p-tau 和 PSD95 的影响

如图 4 所示, 水迷宫结果表明, 与单独铝处理组相比, 在第 3、4、5 天, 铝+雷帕霉素组大鼠的逃避潜伏期时间明显缩短, 同时目标象限停留时间和穿越平台的次数均高于单独铝处理组大鼠, 说明雷帕霉素可以逆转铝引起的大鼠学习记忆损害。大鼠海

马组织中 Western blot 结果表明, 铝+雷帕霉素组大鼠海马组织中 p-mTOR/mTOR 水平下降, 而 p-tau/tau 的比值也下降, PSD95 水平上升 ( $P < 0.05$ ), 提示雷帕霉素可以通过抑制 p-mTOR 的活性, 消除 p-tau 的沉积, 逆转 PSD95 的表达。该实验结果与 PC12 细胞实验结果一致, 进一步验证了雷帕霉素可以逆转铝的神经毒性这一机制。

### 3 讨论

铝是 AD 的重要环境因素, 多项研究表明 AD 患者的脑组织中存在铝含量的过量, 而且针对职业性铝暴露人群的调查研究表明, 铝厂工人经历多年的铝暴露之后, 可以引起认知功能的损害<sup>[11-12]</sup>。本实验中采用大鼠作为亚慢性铝暴露动物模型, 水迷宫结果表明铝处理 3 个月后, 大鼠的学习记忆能力严重受损。这一研究结果与前期人群研究结果一致<sup>[13-14]</sup>。

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 调控一系列生理过程<sup>[15]</sup>。mTOR 在维持神经元突触可塑性方面发挥着重要作用<sup>[16]</sup>, 同时在神经元蛋白质合成中发挥重要的调节作用<sup>[17-18]</sup>。我们之前对铝处理 SD 大鼠的海马组织进行了全转录组测序。生物信息学分析表明, 差异表达的基因高度富集在磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/Akt/mTOR 信号通路<sup>[19]</sup>。因此, 提示 mTOR 在铝诱导的神经毒性中发挥着重要作

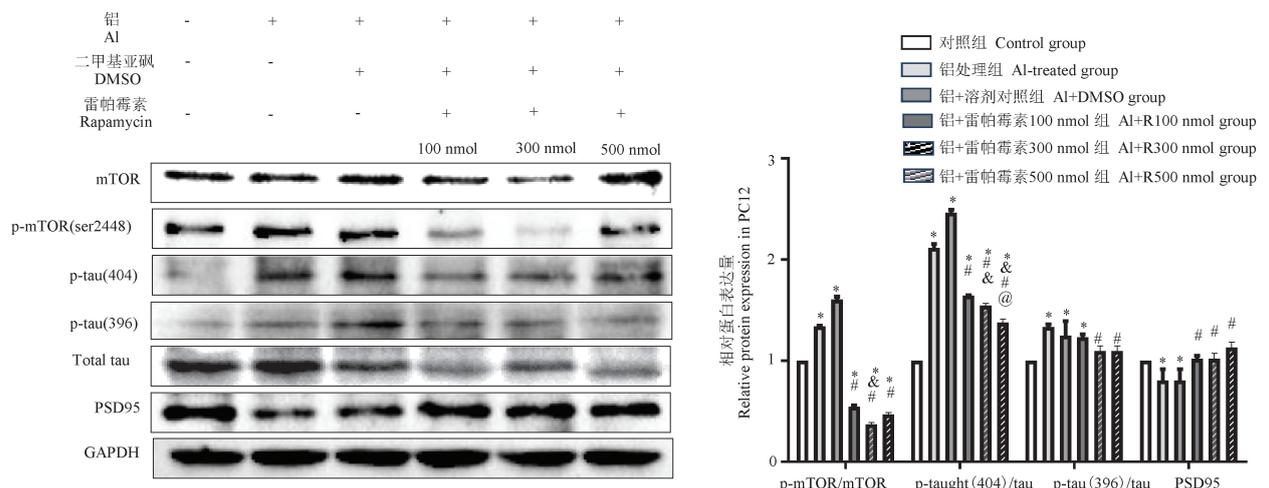
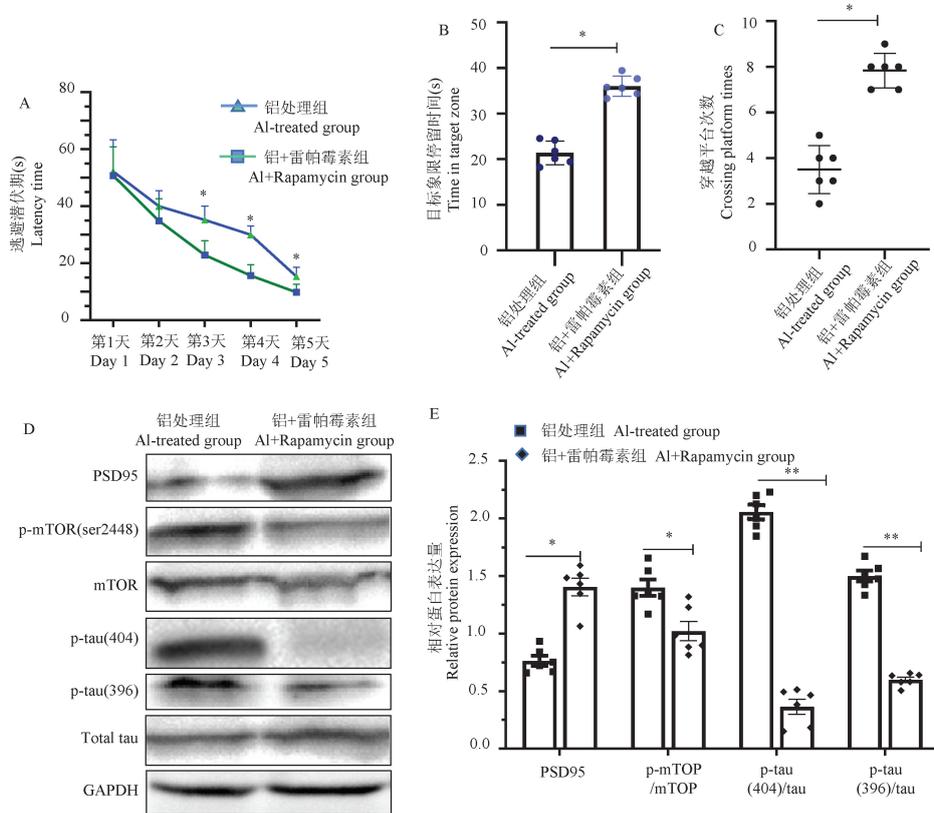


图 3 各组 PC12 细胞中 p-mTOR、p-tau 及 PSD95 Western 图 ( $n = 6$ )

Note. Compared with the control group, \*  $P < 0.05$ . Compared with Al-treated group, #  $P < 0.05$ . Compared with Al+R100 nmol group, &  $P < 0.05$ . Compared with Al+R300 nmol group, @  $P < 0.05$ .

Figure 3 Western blot results of p-mTOR, p-tau and PSD95 in PC12 cells of each group



注:A:两组大鼠连续5 d的逃避潜伏期时间;B:两组大鼠的目标象限停留时间;C:两组大鼠穿越平台次数;D:两组大鼠海马组织中Western blot图。E:两组大鼠海马组织中蛋白表达量统计图。与铝处理组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

图4 雷帕霉素干预后大鼠水迷宫实验结果和大鼠海马组织中蛋白表达结果( $n = 6$ )

Note. A, Escape latency time of rats for 5 consecutive days. B, Target quadrant residence time of rats. C, Crossing the platform times of rats. D, Western blot result of rats' hippocampus. E, Protein expression level of rats' hippocampus. Compared with Al-treated group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

Figure 4 MWM results and Western blot results in rats' hippocampus after Rapamycin treatment

用。本实验结果表明,铝处理大鼠海马组织和PC12细胞中均发现mTOR的磷酸化激活,提示mTOR的激活参与了的铝的神经毒性。而且在本实验中,我们还发现铝处理后出现p-tau蛋白过度沉积和PSD95蛋白的下降,提示mTOR蛋白的激活与p-tau沉积和PSD95的降低有关。

随后为了验证上述结果,我们分别在PC12染铝模型和SD大鼠亚慢性染铝模型中进行雷帕霉素干预实验,结果表明,用雷帕霉素这种mTOR特异性的抑制剂干预之后,可以明显抑制铝引起的mTOR的磷酸化,同时可以减少磷酸化tau蛋白的沉积,恢复PSD95蛋白的表达水平。该结果再次验证mTOR通路激活参与了铝暴露中tau蛋白的过度磷酸化,另外也证明抑制mTOR的活性之后,不仅可以减少磷酸化tau蛋白的沉积,而且可以逆转对PSD95的毒性作用。同时,动物实验表明雷帕霉素可以改善铝引起的大鼠学习记忆下降,减轻铝的神

经毒性。雷帕霉素是临床常用的治疗AD的药物<sup>[20]</sup>,其可以通过抑制mTOR磷酸化水平,改善AD患者的认知障碍<sup>[21]</sup>。本实验结果证明,雷帕霉素同样可以抑制由于铝暴露引起的磷酸化tau蛋白沉积,未来可能成为治疗铝暴露职业人群的干预药物。本研究的不足之处在于本研究未在体内实验中采用雷帕霉素进行干预,未验证其在体内是否可以改善动物的学习和记忆能力,这将是我们的下一步研究方向。

综上所述,mTOR磷酸化激活参与了铝的神经毒性机制。雷帕霉素可以通过抑制mTOR的磷酸化活性,降低铝暴露引起的磷酸化tau蛋白的沉积,减轻铝的神经毒性。

#### 参考文献:

- [1] Colomina MT, Peris-Sampedro F. Aluminum and Alzheimer's disease [J]. Adv Neurobiol, 2017, 18: 183-197.

- [ 2 ] Alasfar RH, Isaifan RJ. Aluminum environmental pollution; the silent killer [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2021, 28(33): 44587-44597.
- [ 3 ] Chiroma SM, Mohd Moklas MA, Mat Taib CN, et al. D-galactose and aluminium chloride induced rat model with cognitive impairments [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 103: 1602-1608.
- [ 4 ] 任佩, 李瑞, 原宇宙, 等. 职业性铝接触对工人认知功能和谷氨酸受体蛋白表达的影响 [J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2017, 35(2): 85-90.
- [ 5 ] Blennow K, Zetterberg H. Biomarkers for Alzheimer's disease; current status and prospects for the future [J]. *J Intern Med*, 2018, 284(6): 643-663.
- [ 6 ] Mold MJ, O' Farrell A, Morris B, et al. Aluminum and tau in neurofibrillary tangles in familial Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis Rep*, 2021, 5(1): 283-294.
- [ 7 ] Weichhart T. mTOR as regulator of lifespan, aging, and cellular senescence; a mini-review [J]. *Gerontology*, 2018, 64(2): 127-134.
- [ 8 ] Querfurth H, Lee HK. Mammalian/mechanistic target of rapamycin (mTOR) complexes in neurodegeneration [J]. *Mol Neurodegener*, 2021, 16(1): 44.
- [ 9 ] Li H, Xue X, Li L, et al. Aluminum-induced synaptic plasticity impairment via PI3K-Akt-mTOR signaling pathway [J]. *Neurotox Res*, 2020, 37(4): 996-1008.
- [ 10 ] Song J, Gao T, Li W, et al. The palmitoylation/depalmitoylation cycle is involved in the inhibition of AMPA receptor trafficking induced by aluminum *in vitro* [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2023, 201(3): 1398-1406.
- [ 11 ] Bagepally BS, Balachandar R, Kalahasthi R, et al. Association between aluminium exposure and cognitive functions: a systematic review and meta-analysis [J]. *Chemosphere*, 2021, 268: 128831.
- [ 12 ] Klotz K, Weistenhöfer W, Neff F, et al. The health effects of aluminum exposure [J]. *Dtsch Arztebl Int*, 2017, 114(39): 653-659.
- [ 13 ] Lu X. Occupational exposure to aluminum and cognitive impairment [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1091: 85-97.
- [ 14 ] 夏佳蕊, 刘佳琪, 李宗高, 等. 铝过量接触与蓄积对脑功能及阿尔茨海默病发生影响的研究进展 [J]. *神经解剖学杂志*, 2018, 34(4): 535-539.
- [ 15 ] Saxton RA, Sabatini DM. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease [J]. *Cell*, 2017, 168(6): 960-976.
- [ 16 ] Switon K, Kotulska K, Janusz-Kaminska A, et al. Molecular neurobiology of mTOR [J]. *Neuroscience*, 2017, 341: 112-153.
- [ 17 ] Bockaert J, Marin P. mTOR in brain physiology and pathologies [J]. *Physiol Rev*, 2015, 95(4): 1157-1187.
- [ 18 ] Graber TE, McCamphill PK, Sossin WS. A recollection of mTOR signaling in learning and memory [J]. *Learn Mem*, 2013, 20(10): 518-530.
- [ 19 ] Xu Y, Zhang H, Pan B, et al. Transcriptome-wide identification of differentially expressed genes and long non-coding RNAs in aluminum-treated rat hippocampus [J]. *Neurotox Res*, 2018, 34(2): 220-232.
- [ 20 ] 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.
- [ 21 ] Mueed Z, Tandon P, Maurya SK, et al. Tau and mTOR; the hotspots for multifarious diseases in Alzheimer's development [J]. *Front Neurosci*, 2019, 12: 1017.

〔收稿日期〕2022-10-30