

• 短篇论著 •

APP5 肽类似物 P165 对糖尿病脑病小鼠海马胰岛素受体、胰岛素受体底物-1 的影响

冯波 王蓉 赵志炜 刘梦霞 盛树力

糖尿病大鼠存在学习记忆功能障碍和神经元信号转导通路相关蛋白表达异常,APP17 肽(amyloid protein precursor 319-335 peptide)能够使这些异常改变恢复或接近恢复至正常水平^[1-3]。APP5 肽是 APP17 肽的活性序列,其类似物 P165 具有抗酶解能力。本研究观察糖尿病小鼠海马神经元胰岛素受体(insulin receptor, IR)、胰岛素受体底物-1(insulin receptor substrate-1, IRS-1)的变化及 P165 对上述变化的影响。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及动物模型建立 昆明小鼠,雄性,体重 28~32g,SPF 级,购自中国医学科学院药物研究所。随机分为 3 组,正常对照组(C 组),糖尿病组(DM 组),糖尿病+P165 治疗组(DM+P165 组),禁食 12h 后,按照 180mg/kg 链脲佐菌素(streptozotocin)腹腔注射,3d 后用宝丽曼血糖仪测尾非禁食血糖,血糖>15mmol/L 者为糖尿病模型造模成功。成模后,再随机分为两组,即 DM 组和 DM+P165 组,DM+P165 组每天按照 P165 4μg/只灌胃,C 组和 DM 组给予等体积无菌生理盐水灌胃,共 5 周(C 组 n=12,DM 组 n=9,DM+P165 组 n=10)。

1.2 免疫组织化学方法 按我室常规方法进行^[2],免源性抗 IR 抗体(1:1000)、IRS-1 抗体(1:2000)和羊抗兔 IgG 以及 DAB 显色液均购自北京中杉金桥生物技术有限公司,DAB 显色。在 10 倍物镜下计算海马 CA1 区的阳性神经元数目。

1.3 Western-blot 方法 按宣武医院神经生化室常规方法进行^[3],用 Lowry 法定量,配平各组蛋白均为 8g/L。抗 β-actin 抗体(1:1000)、IR 抗体(1:1000)、IRS-1 抗体(1:2000)、碱性磷酸酶显色液为北京中杉金桥生物技术有限公司产品,标准蛋白为 Santa Cruz 生物技术公司产品,碱性磷酸酶显色。Bandscan 分析显色条带,设人工单位(U),1U=

OD1000。

1.4 统计学分析 采用 SPSS11.5 软件进行单因素方差分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结 果

2.1 免疫组织化学染色结果 IR、IRS-1 阳性反应神经元 DM 组在海马 CA1 区明显增多,与 C 组比较有显著性差异($P<0.01$);高倍镜下,胞浆和突起深染(图 1,2,表 1);经过 P165 治疗后,表达比 DM 组减少($P<0.05$)。

表 1 各组小鼠海马 CA1 区 IR、IRS-1 阳性细胞的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	IR	IRS-1
C 组	82.90±7.59	86.90±9.18
DM 组	107.40±10.51*	113.00±11.57*
DM+P165 组	91.10±8.50#	97.43±14.99#

注:与 C 组比较,* $P<0.01$,与 DM 组比较,# $P<0.01$

2.2 Western-blot 结果 C 组,DM 组,DM+P165 组 β-actin 无明显差异(图 3)。DM 组小鼠 IR 表达比 C 组增加($P<0.01$),经过 P165 治疗后,IR、IRS-1 表达比 DM 组减少($P<0.05$);DM 组小鼠 IRS-1 表达比 C 组增加($P<0.05$),经过 P165 治疗后,IR、IRS-1 表达比 DM 组减少($P<0.05$),见图 4,5 和表 2。

表 2 各组小鼠海马 CA1 区 IR、IRS-1 Western-blot 灰度的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	IR	IRS-1
C 组	293.67±56.87	518.67±44.09
DM 组	436.33±39.31*	752.00±130.98*
DM+P165 组	328.67±28.75 [△]	597.44±143.05 [#]

注:与 C 组比较,* $P<0.05$,# $P<0.01$,与 DM 组比较,[△] $P<0.05$

3 讨 论

胰岛素结合 IR,引起 IR 自身磷酸化,继而导致 IRS-1 的酪氨酸磷酸化,从而引起下游磷脂酰肌醇-3 激酶和有丝分裂原激活蛋白级联反应,最终使 cAMP 反应元件结合蛋白磷酸化,作用于核内基因转录而使神经元存活^[4,5]。胰岛素信号转导通路在实现胰岛素生物效应的过程中,在多个环节受到调控。有些病理性因素通过对胰岛素信号蛋白的影响而影响

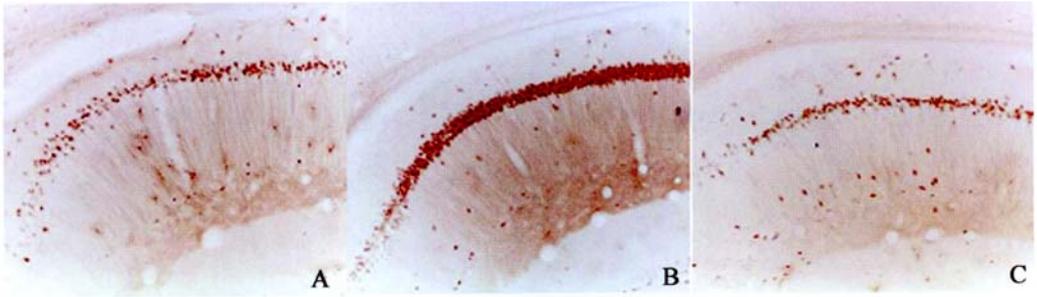
收稿日期:2006-08-08

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)课题(2003CB517104);国家自然科学基金(30772288)

作者单位:100053 北京市,首都医科大学宣武医院教育部神经变性病重点实验室(冯波、王蓉、赵志炜、刘梦霞、盛树力);现工作单位:256603 滨州市,滨州医学院附属医院神经内科

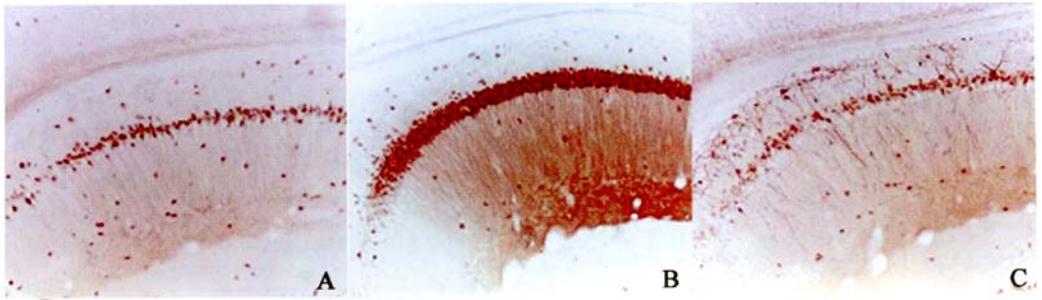
作者简介:冯波,女,1981 年 12 月生,山东省滨州市人,医学硕士,住院医师。Tel:13505437117,E-mail:fengpeiping@163.com

通讯作者:王蓉,Tel:010-63159572,Fax:010-63159572,E-mail:rong_wang72@yahoo.com.cn



A;C组 B;DM组 C;DM+P165组

图1 P165对糖尿病小鼠海马CA1区IR表达的影响(DAB染色,×100)



A;C组 B;DM组 C;DM+P165组

图2 P165对糖尿病小鼠海马CA1区IRS-1表达的影响(DAB染色,×100)



C组 DM组 DM+P165组

图3 β -actin 三组中无明显差异



C组 DM组 DM+P165组

图4 IR在各组海马组织的表达



C组 DM组 DM+P165组

图5 IRS-1在各组海马组织的表达

胰岛素信号传递,故脑内胰岛素信号转导障碍是糖尿病脑病的最重要的病理过程之一。

糖尿病小鼠海马组织 IR、IRS-1 表达增加,提示糖尿病小鼠海马神经元发生了适应性变化,以求充分利用已减少的胰岛素。当一种存活因子严重不足时,神经元不仅没有明显

的功能代偿,相反,其它神经营养因子下降,只有供给大量外源性神经存活因子,其它神经营养因子才可恢复^[6]。糖尿病小鼠在严重缺乏神经营养因子胰岛素的情况下,给予适量的具有神经营养和神经保护作用的小分子多肽 P165,以改善胰岛素缺乏引起的神经元退行性变。

本研究证实 P165 具有抗酶解能力,P165 可能通过调节胰岛素信号通路相关蛋白表达,促进神经元功能的恢复,从而改善其学习记忆功能障碍。

参考文献

- [1] Zhao YM, Pei JJ, Ji ZJ, et al. Effect of amyloid precursor protein 17mer peptide on microtubule structure and tau protein hyperphosphorylation in hippocampal neurons of experimental diabetic mice. Neuroreport, 2003, 14:61-66.
- [2] 左晓虹,姬志娟,艾厚喜,等. DM 大鼠海马神经元信号传导途径的异常及 APP17 肽的作用. 中国糖尿病杂志, 2002, 10:85-88.
- [3] 李红星,赵志伟,姬志娟,等. APP17 肽对链佐尾-大鼠海马胰岛素信号转导相关蛋白表达的影响. 中华老年多器官疾病杂志, 2002, 1:204-208.
- [4] 盛树力. 糖尿病脑病和老年性痴呆. 中华内分泌代谢杂志, 2001, 17:58-59.
- [5] 盛树力. 老年性痴呆及相关疾病. 北京:科学技术文献出版社, 2006. 233-246.
- [6] 王蓬文,盛树力,杨芳,等. APP17 肽对糖尿病小鼠海马 IRS-1、ICF-1R 表达的影响. 解剖学报, 2001, 32:343-345.