

研究论文

雷帕霉素对STZ诱导的HT22细胞损伤的保护作用

王祎¹ 朱梦姚¹ 郭自贺¹ 袁海阳¹ 贡岳松^{1,2*}¹南京中医药大学药学院, 南京 210023; ²江苏鹏鹞药业新药创新中心, 宜兴 214200

摘要 该研究探究雷帕霉素对链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导的HT22细胞损伤的神经保护作用。利用STZ诱导HT22细胞建立神经细胞损伤模型, 给予HT22细胞不同浓度的雷帕霉素进行预保护, 采用MTT法筛选STZ造模浓度和雷帕霉素最佳保护浓度; 将HT22细胞分为对照组(con)、模型组(STZ)和雷帕霉素组(Rap), HE染色观察神经细胞形态及突触结构; Hoechst 33342染色观察细胞凋亡情况; 相应的商品试剂盒检测各组细胞乳酸脱氢酶(LDH)活性、超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量; Western blot法检测细胞p-AMPK/AMPK、p-mTOR/mTOR、NR2B、NR1、PSD 95蛋白表达情况。实验结果显示, 与对照组相比, STZ可明显导致HT22细胞损伤, 1.0 μmol/L雷帕霉素对STZ诱导的神经损伤具有最佳保护效果; 与对照组相比, 模型组细胞突触结构损伤严重, STZ诱导HT22细胞凋亡, SOD活性显著下降($P<0.05$), LDH活性($P<0.001$), MDA含量显著上升($P<0.001$), p-AMPK/AMPK($P<0.001$), NR2B($P<0.001$), NR1($P<0.05$), PSD 95($P<0.001$)蛋白表达水平显著下降, p-mTOR/mTOR蛋白表达水平显著上升($P<0.001$)。与模型组相比, 雷帕霉素能保护神经细胞形态和突触结构, 抑制细胞凋亡, 提高SOD活性($P<0.05$), 降低LDH活性($P<0.001$), MDA含量($P<0.01$), 上调p-AMPK/AMPK($P<0.001$), NR2B($P<0.05$), NR1($P<0.05$), PSD 95($P<0.01$)蛋白表达水平, 下调p-mTOR/mTOR蛋白表达水平($P<0.01$)。总之, 雷帕霉素能减轻STZ诱导的HT22细胞氧化应激损伤, 抑制细胞凋亡, 保护神经细胞突触结构, 其机制可能与AMPK/mTOR通路调控突触蛋白PSD 95和NMDA受体活性有关。

关键词 雷帕霉素; HT22细胞; 突触蛋白; AMPK; mTOR

Protective Effect of Rapamycin on STZ-Induced Injury in HT22 Cells

WANG Yi¹, ZHU Mengyao¹, GUO Zihe¹, YUAN Haiyang¹, GONG Yuesong^{1,2*}¹School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;²Jiangsu Pengyao Pharmaceutical New Drug Innovation Center, Yixing 214200, China)

Abstract This study investigated the neuroprotective effect of rapamycin on STZ (streptozotocin) induced HT22 cell damage. A STZ-induced HT22 cell injury model was established and pretreated with different concentrations of rapamycin. Cell viability was detected by MTT to determine the optimal concentration of pre-protection of rapamycin. The cells were divided into control (con), model (STZ) and rapamycin (Rap) groups, and the neuronal morphology and synaptic structure were observed by HE staining. Cell apoptosis was observed by Hoechst 33342 staining. Cell LDH (lactate dehydrogenase) activity, SOD (superoxide dismutase) activity and MDA (malondialde-

收稿日期: 2022-10-31

接受日期: 2022-12-16

高级人才科研启动基金(批准号: 013074004016)和江苏省双创计划(批准号: 013033004004A)资助的课题

*通讯作者。Tel: 15605170283, E-mail: ygong@njucm.edu.cn

Received: October 31, 2022

Accepted: December 16, 2022

This work was supported by the Research Foundation for Advanced Talents (Grant No.013074004016) and the Jiangsu Provincial Dual Initiative (Grant No.013033004004A)

*Corresponding author. Tel: +86-15605170283, E-mail: ygong@njucm.edu.cn

hyde) content in each group were detected by test kits. The protein expression levels of p-AMPK/AMPK, p-mTOR/mTOR, NR2B, NR1, and PSD 95 in cells were determined by Western blot. The results showed that STZ significantly induced HT22 cell damage compared with the control group, 1.0 $\mu\text{mol/L}$ rapamycin showed the best protective effect on nerve injury induced by STZ. Compared with the control group, the model group showed severe synaptic structure damage, HT22 cells were induced to apoptosis by STZ, SOD activity significantly decreased ($P<0.05$), LDH activity ($P<0.001$) and MDA content significantly increased ($P<0.001$), p-AMPK/AMPK ($P<0.001$), NR2B ($P<0.001$), NR1 ($P<0.05$) and PSD 95 ($P<0.001$) protein expression levels significantly decreased, and p-mTOR/mTOR protein expression levels significantly increased. Compared with the model group, rapamycin protected neuronal morphology and synaptic structure, inhibited cell apoptosis, increased SOD activity ($P<0.05$), decreased LDH activity ($P<0.001$) and MDA content ($P<0.01$), upregulated p-AMPK/AMPK ($P<0.001$), NR2B ($P<0.05$), NR1 ($P<0.05$), PSD 95 ($P<0.01$) protein expression and downregulated p-mTOR/mTOR protein expression ($P<0.01$). In conclusion, rapamycin can attenuate oxidative stress injury, inhibit apoptosis, and protect synaptic structure in STZ induced HT22 cells, and the mechanism may be related to the regulation of synaptic protein PSD 95 and NMDA receptor activity by AMPK/mTOR pathway.

Keywords rapamycin; HT22 cells; synaptic proteins; AMPK; mTOR

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是老年痴呆症中最常见的一种神经退行性疾病, 患病人数占老年痴呆症患者总人数的 60%~70%。AD 的临床表现主要为认知功能障碍、记忆减退等, 并伴随抑郁、暴躁等情绪异常^[1-2]。大脑能量代谢紊乱是 AD 的发病关键因素之一, 脑组织代谢物尤其是葡萄糖代谢的异常与记忆损伤关系密切。链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 属于氨基葡萄糖-亚硝基脲, 侧脑室注射 STZ 能破坏脑中的葡萄糖和能量代谢, 造成神经细胞功能受损。同时, STZ 还能通过引起 DNA 烷基化和断裂, 产生过量的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 和自由基, 造成氧化应激损伤^[3]。STZ 诱导神经细胞发生凋亡、突触丢失、tau 蛋白异常磷酸化和线粒体功能障碍^[4], 这些损伤会影响突触传递和突触可塑性, 导致学习记忆功能障碍, 与 AD 的病理特征相似。因此, STZ 常被用于 AD 的研究。

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 参与基因转录、蛋白质翻译、核糖体合成等生物过程, 对参与神经元发育和功能的基因有显著影响, 从而调节细胞周期、增殖和死亡^[5], 在细胞的生长、凋亡、代谢和自噬等过程中发挥了重要作用。中枢神经系统中的 mTOR 在海马体突触可塑性调节中起着关键作用^[6]。雷帕霉素 (rapamycin, Rapa) 是一种大环内酯类免疫抑制剂, 能特异性抑制 mTOR, 通过调控蛋白质的合成和诱导自噬, 减少 A β 等错误折叠和聚集的蛋白质的积累, 从而达到改善

AD 小鼠认知功能障碍的目的^[7]。本研究通过使用 STZ 诱导 HT22 细胞模拟 AD 病变进行体外实验, 初步探究雷帕霉素对神经细胞的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 小鼠海马神经元细胞系 HT22 购自上海誉弛生物科技有限公司。

1.1.2 药物与试剂 雷帕霉素 (批号: H28O8J46796) 购自上海源叶生物科技有限公司; 链脲佐菌素 (批号: #WXBD5718V) 购自美国 Sigma 公司; DMEM 培养基购自武汉塞维尔生物技术有限公司; 0.25% 胰酶消化液购自美国 HyClone 公司; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自美国 Lonsera 公司; DMSO 购自南京迈博生物科技有限公司; MTT、青-链霉素混合液购自北京索莱宝科技有限公司; 苏木素-伊红染液 (批号: CR2109160)、尼氏染液 (批号: CR2108038)、RIPA 裂解液 (批号: HJ194302) 购自武汉塞维尔生物科技有限公司; Hoechst 33342 染色液、BCA 试剂盒购自上海碧云天生物研究所; 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 试剂盒 (批号: 20211224)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒 (批号 20211225)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 试剂盒 (批号: 20220718) 购自南京建成生物工程研究所; Compound C (AMPK 抑制剂) 购自美国 MedChemexpress 公司; 磷酸酶抑制剂 (批号: 20220105)、ECL 超敏发光液 (批号:

20211201)购自杭州弗德生物科技有限公司; NR1抗体(批号: 5704S)、PSD 95抗体(批号: 3409S)、AMPK抗体(批号: 5831S)、p-AMPK抗体(批号: 2535S)、mTOR抗体(批号: 2972S)购自美国CST公司; p-mTOR抗体(批号: 20220217)购自湖南艾方生物科技有限公司; NR2B抗体(批号: 00098893)、GAPDH抗体(批号: 10015666)购自美国Proteintech公司; 二抗山羊抗鼠IgG HRP(批号: 21347584)、山羊抗兔IgG HRP(批号: 21253865)购自合肥白鲨生物科技有限公司。

1.1.3 仪器 细胞培养箱(HERAcell150i型)购自美国Thermo公司; 微量冷冻离心机(Microfuge 20R)购自美国Beckman Coulter公司; 蛋白电泳仪、电泳槽、垂直电泳槽、转移槽、转移电泳槽、凝胶成像系统购自上海天能科技有限公司; 纯水系统(Elix ESSENTIAL 3/SYNERGY)购自赛飞(中国)生物科技有限公司; 酶标仪(Tecan infinite 200PRO)购自瑞士Teacn公司; 倒置荧光显微镜(IX73型)购自日本Olympus公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HT22细胞用含10%胎牛血清和2%青-链霉素混合液的DMEM完全培养基培养, 定期观察传代情况。

1.2.2 STZ损伤细胞模型的建立 待细胞进入对数生长期后, 以 5×10^4 个/mL的密度将细胞接种于96孔板中, 每孔100 μ L, 每组设6个复孔, 置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂恒温培养箱中培养。待细胞贴壁后, 吸弃培养液, 再以含不同浓度(2、4、8、12、16 mmol/L) STZ的DMEM继续培养24 h。每孔加入10 μ L MTT溶液, 于37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中避光孵育3 h, 弃去上清液, 加入150 μ L DMSO, 用酶标仪于490 nm波长处测定吸光度(*D*)值, 实验重复3次。计算细胞存活率, 筛选STZ损伤细胞的最适浓度。

1.2.3 雷帕霉素给药浓度确定 按“1.2.2”方法将细胞接种于96孔板中。将细胞分为对照组(con)、DMSO组、雷帕霉素组(Rap, 0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 μ mol/L), 每组设6个复孔, 培养24 h。每孔加入10 μ L MTT溶液, 37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中避光孵育3 h, 弃去上清液, 加入150 μ L DMSO, 用酶标仪于490 nm波长处测定*D*值, 实验重复3次。计算细胞存活率, 确定雷帕霉素的安全给药范围。

按“1.2.2”方法将细胞接种于96孔板中。将细胞分为对照组(con)、模型组(STZ)、DMSO组、雷帕霉素组(Rap, 0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 μ mol/L)和调零空白组, 每组设6个复孔。Rap组细胞用雷帕霉素预保护

6 h后, 再与上述实验确定的最佳损伤浓度的STZ共同培养24 h。每孔加入10 μ L MTT溶液, 37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中避光孵育3 h, 弃去上清液, 加入150 μ L DMSO, 用酶标仪于490 nm波长处测定*D*值, 实验重复3次。计算细胞存活率, 确定雷帕霉素的最佳给药浓度。

1.2.4 HE染色观察细胞形态和突触 将细胞爬片置于24孔板中, HT22细胞以 8×10^4 个/mL的密度接种于24孔板中, 细胞分为对照组(con)、模型组(STZ)和雷帕霉素组(Rap), 对照组和模型组中加入等体积的DMSO。培养24 h后, 取出爬片, PBS洗涤3次, 95%乙醇固定20 min, PBS冲洗2次, 苏木素-伊红染液染色。在光学显微镜下观察各组细胞形态, 拍照记录。

1.2.5 Hoechst 33342染色检测细胞凋亡情况 HT22细胞以 8×10^4 个/mL的密度接种于24孔板中, 分组给药处理后, 吸弃培养基, PBS冲洗2次, 避光加入Hoechst 33342染色液, 染色5 min, 吸弃染色液, PBS冲洗2次, 荧光倒置显微镜下观察拍照。

1.2.6 细胞培养液中LDH的测定 取对数生长期的HT22细胞以 2×10^5 个/mL的密度接种于6孔板中, 给药处理完成后收集细胞培养基上清液, 按照LDH商品试剂盒说明书方法进行检测。

1.2.7 细胞组织中SOD活性和MDA含量的测定 取对数生长期的HT22细胞以 2×10^5 个/mL的密度接种于6孔板中, 给药处理完成后吸弃上清, 用4 $^{\circ}$ C预冷的PBS冲洗2次, 加入RIPA裂解液、PMSF以及磷酸酶抑制剂于冰上静置5 min裂解, 裂解后刮取细胞置于离心管中, 在4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min条件下离心15 min, 取上清液, 超声破碎细胞, BCA法测蛋白浓度。按照SOD和MDA商品试剂盒说明书方法检测SOD活性和MDA含量。

1.2.8 Western blot法检测细胞中NR2B、NR1、PSD 95、p-mTOR、p-AMPK的表达情况 实验设对照组(con)、模型组(STZ)、雷帕霉素组(Rap)和雷帕霉素+Compound C组(Rap+C), 按照“1.2.8”方法提取细胞, 采用BCA法测定蛋白浓度, 计算上样体积, 加入上样缓冲液。采用SDS-PAGE电泳, NC膜湿转, 使用5%脱脂牛奶室温封闭1 h。加入兔抗NR1(1:2 000)、兔抗NR2A(1:1 000)、兔抗NR2B(1:3 000)、兔抗AMPK(1:3 000)、兔抗p-AMPK(1:4 000)、兔抗mTOR(1:1 000)、兔抗p-mTOR(1:2 000)、鼠抗GAPDH(1:8 000, 作为内参), 4 $^{\circ}$ C孵育过夜。TBST洗膜, 然后加入二抗山羊抗鼠IgG HRP(1:10 000)或者山羊抗兔IgG

HRP(1:10 000)室温孵育1 h, TBST洗膜, 显影分析。

1.2.9 统计学分析 实验数据采用GraphPad Prism 9进行统计学分析, 实验结果以均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 组间差异相比采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 STZ对HT22细胞活性的影响

用不同浓度的STZ作用于HT22细胞24 h。MTT检测结果显示, STZ损伤后的细胞存活率呈剂量依赖性下降, 最终选择细胞存活率约为60%时的STZ浓度, 即8 mmol/L作为造模浓度(图1)。

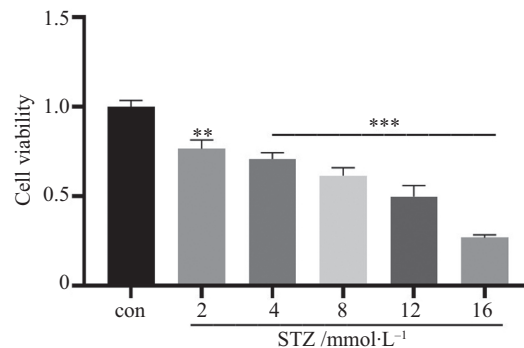
2.2 雷帕霉素对HT22细胞活性的影响

对雷帕霉素给药浓度范围的研究结果显示, 雷帕霉素浓度范围在0.5~4.0 $\mu\text{mol/L}$ 时对HT22细胞存

活率无显著影响, 8.0 $\mu\text{mol/L}$ 雷帕霉素可显著降低HT22细胞存活率($P<0.001$), 微量DMSO对细胞的影响较小, 可忽略不计。细胞与STZ共同孵育24 h, 结果显示, 与模型组相比, 0.5、1.0、2.0 $\mu\text{mol/L}$ 雷帕霉素对HT22细胞的保护作用显著增强($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.05$)(图2)。考虑到雷帕霉素本身具有一定的细胞毒性, 我们选择1.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度进行后续实验。

2.3 雷帕霉素对细胞形态的影响

突触可塑性与突触结构和传递效能密切相关, 突触结构缺失会降低突触可塑性, 进而影响学习记忆的形成^[8]。在轻度AD患者脑中也发现了突触丢失, 神经细胞间突触连接的破坏被认为是AD患者认知功能障碍的根源^[9]。通过HE染色观察细胞的形态, 对照组细胞呈菱形, 细胞膜完整, 核仁清晰, 突触结构完整, 突触间呈网状连接。STZ处理过的细胞形态不规则, 树突数量较对照组明显减少, 胞质流失, 部分细胞出现皱

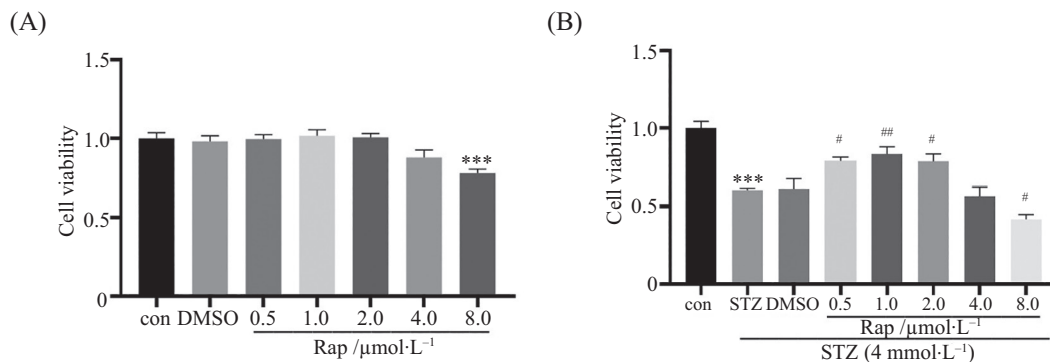


** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与对照组相比; $n=6$ 。

** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs con group; $n=6$ 。

图1 不同浓度STZ对HT22细胞存活率的影响

Fig.1 Effects of different concentrations of STZ on the survival rate of HT22 cells



A:不同浓度的雷帕霉素对HT22细胞存活率的影响; B: 不同浓度的雷帕霉素对STZ诱导的HT22细胞存活率的影响。*** $P<0.001$, 与对照组相比; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, 与模型组相比; $n=6$ 。

A: effects of different concentrations of rapamycin on viability of HT22 cells; B: effects of different concentrations of rapamycin on the viability of STZ induced HT22 cells. *** $P<0.001$ vs con group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs STZ group; $n=6$ 。

图2 不同浓度雷帕霉素对HT22细胞存活率的影响

Fig.2 Effects of rapamycin with different concentrations on the survival rate of HT22 cells

缩, 细胞核边集化, 无法形成正常的突触结构, 表现出AD患者突触丢失的病理特征。雷帕霉素与STZ共同孵育的细胞数量较模型组增多, 少数细胞呈长菱形, 细胞核固缩、边集化, 多数细胞突触结构完整, 形态正常, 说明雷帕霉素能保护神经细胞的形态结构(图3)。

2.4 雷帕霉素抑制细胞凋亡

经Hoechst 33342染色液染色后, 对照组细胞呈淡蓝色, 模型组细胞呈亮蓝色, 表明STZ能诱导HT22细胞凋亡($P<0.001$)。与模型组相比, 雷帕霉素能减轻STZ诱导的凋亡损伤($P<0.001$)(图4)。

2.5 雷帕霉素对STZ诱导的HT22细胞中LDH、SOD和MDA的影响

氧化应激会造成细胞损伤、凋亡, 从而诱发神经

发育损伤和神经退行性疾病。LDH能反映细胞的损伤程度; SOD可以清除氧自由基, 能够反映机体的抗氧化能力; 自由基反应产物MDA可以反映细胞的氧化损伤程度; 上述三种指标均可以用于评估细胞的氧化应激反应。结果显示, 与对照组相比, 模型组的LDH活性和MDA含量显著升高($P<0.001$), SOD活性显著降低($P<0.05$), 细胞损伤严重; 雷帕霉素组LDH活性显著升高($P<0.05$)。与模型组相比, 雷帕霉素组LDH活性和MDA含量显著降低($P<0.01$, $P<0.001$), SOD活性显著升高($P<0.05$), 这说明雷帕霉素能减轻细胞损伤(图5)。

2.6 雷帕霉素对HT22细胞中p-mTOR、p-AMPK蛋白表达的影响

mTOR和AMPK是重要的能量代谢调节因子,

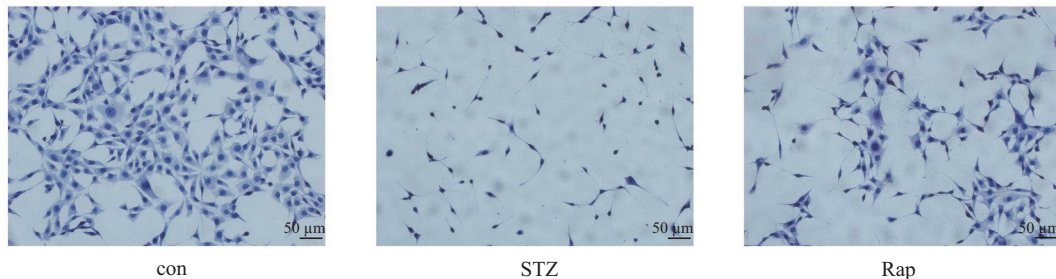
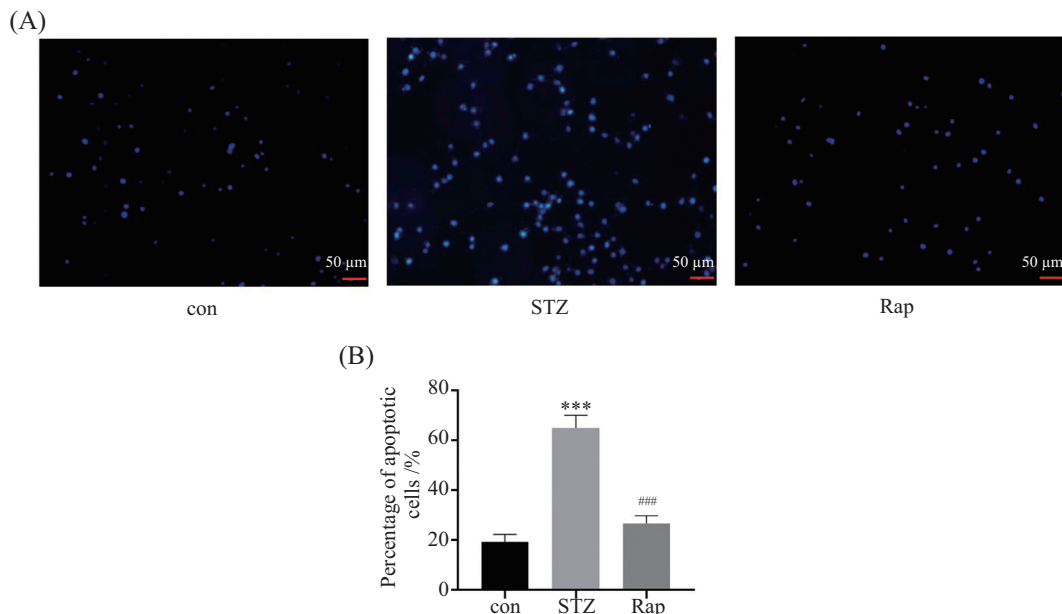


图3 雷帕霉素对STZ诱导的HT22细胞形态的影响

Fig.3 Effect of rapamycin on the morphology of HT22 cells induced by STZ

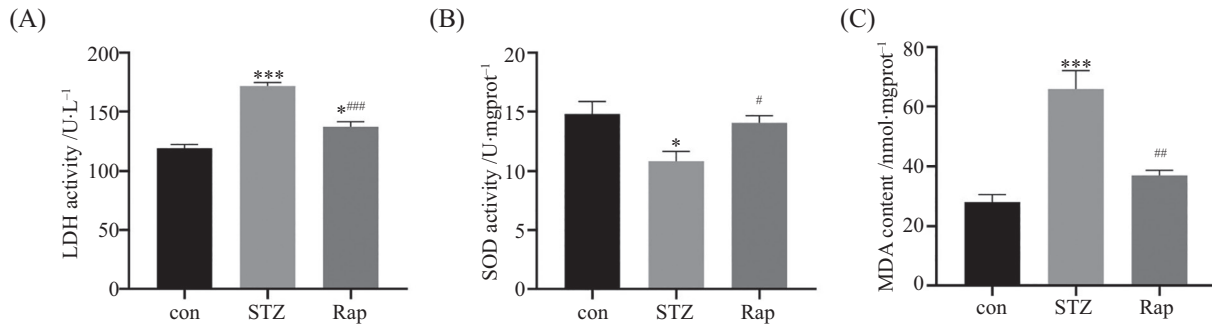


A: Hoechst 33342染色图片; B: 各组细胞凋亡情况统计图。*** $P<0.001$, 与对照组相比; ### $P<0.001$, 与模型组相比; $n=3$ 。

A: Hoechst 33342 staining picture; B: statistical chart of apoptosis in each group. *** $P<0.001$ vs con group; ### $P<0.001$ vs STZ group; $n=3$.

图4 雷帕霉素抑制STZ诱导的HT22细胞凋亡

Fig.4 Rapamycin inhibits STZ induced apoptosis of HT22 cells

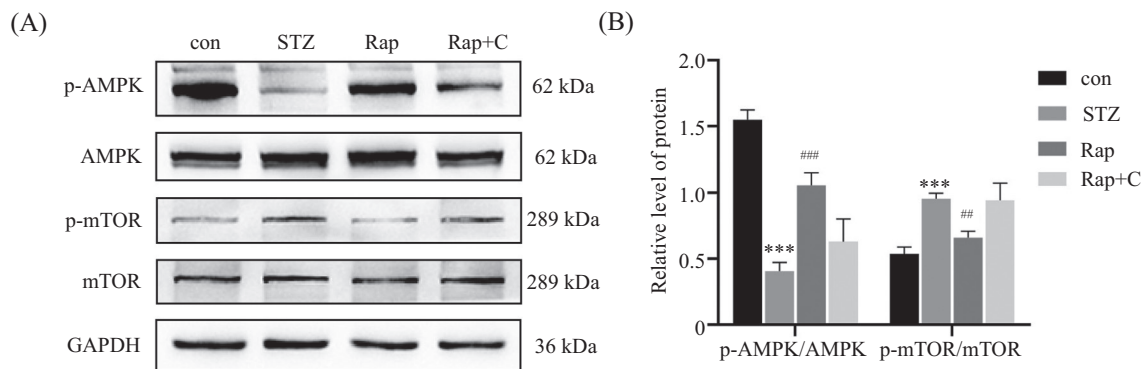


A: 各组细胞LDH活力; B: 各组细胞SOD活力; C: 各组细胞MDA含量。* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, 与模型组相比; $n = 4$ 。

A: LDH activity of cells in each group; B: SOD activity of cells in each group; C: MDA content of cells in each group. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs con group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs STZ group; $n = 4$ 。

图5 雷帕霉素对STZ诱导的HT22细胞LDH、SOD和MDA的影响

Fig.5 Effects of rapamycin on STZ induced LDH, SOD and MDA in HT22 cells



A: Western blot条带图; B: 灰度值分析。*** $P < 0.001$, 与对照组相比; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, 与模型组相比; $n = 4$ 。

A: Western blot banding pattern; B: gray value analysis. *** $P < 0.001$ vs con group; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs STZ group; $n = 4$ 。

图6 雷帕霉素对p-AMPK和p-mTOR的影响

Fig.6 Effects of rapamycin on p-AMPK and p-mTOR

AMPK的活化会抑制mTOR的表达。Western blot结果显示,三组细胞AMPK和mTOR蛋白的表达无显著变化。与对照组相比,STZ处理过的细胞p-AMPK蛋白表达量显著降低($P < 0.001$),p-mTOR蛋白表达量显著升高($P < 0.001$)。与模型组相比,雷帕霉素组细胞p-AMPK蛋白表达量显著升高($P < 0.001$),p-mTOR蛋白表达量显著降低($P < 0.01$);雷帕霉素+Compound C组p-AMPK和p-mTOR与模型组相比无显著变化,这表明雷帕霉素能激活AMPK/mTOR通路(图6)。

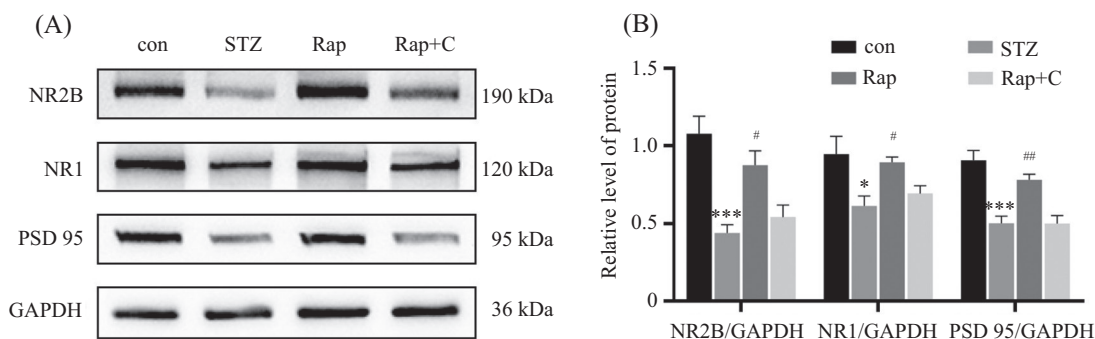
2.7 雷帕霉素对HT22细胞中NR2B、NR1、PSD 95蛋白表达的影响

模型组细胞树突数量减少,突触损伤严重,雷帕霉素可以保护神经细胞的树突结构,为了进一步研究突触的变化,采用Western blot法检测细胞中突触相关蛋白NMDA受体NR2B、NR1和PSD 95蛋白的表达

量。结果显示,与对照组相比,STZ处理过的细胞中NR2B($P < 0.001$)、NR1($P < 0.05$)和PSD 95($P < 0.001$)蛋白表达量均显著降低。与模型组相比,雷帕霉素组细胞中NR2B($P < 0.05$)、NR1($P < 0.05$)、PSD 95($P < 0.01$)蛋白表达量均显著升高;雷帕霉素+Compound C组突触相关蛋白与模型组相比无显著变化,提示雷帕霉素能上调突触相关蛋白表达,改善突触功能障碍(图7)。

3 讨论

随着老龄化进程的加剧,全球AD患者数量急剧上升,AD已经成为社会发展中不可忽视的难题。突触可塑性是学习和记忆的神经基础,AD的发病机制与突触可塑性密切相关。研究表明,AD患者的突触损伤要先于神经元细胞的丢失^[10],与认知功能直接相关,神经细胞间突触连接的破坏被认为是AD患者



A: Western blot条带图; B: 灰度值分析。* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与模型组相比; $n = 4$ 。

A: Western blot banding patterns; B: gray scale value analysis. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs con group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs STZ group; $n = 4$ 。

图7 雷帕霉素对NR2B、NR1和PSD 95的影响

Fig.7 Effects of rapamycin on NR2B, NR1 and PSD 95

认知功能障碍的根源^[9]。突触损伤可能涉及线粒体损伤、神经炎症和氧化应激等^[11]。本实验结果显示, STZ能损伤HT22细胞并且该损伤呈剂量依赖性。模型组细胞SOD活性下降, MDA含量上升, 表明STZ能够诱导HT22细胞发生氧化应激反应, 引起细胞凋亡, 进而破坏细胞的结构和突触功能; 而雷帕霉素处理有效抑制了STZ诱导的细胞损伤和氧化应激的发生, 减少了细胞凋亡, 保护了细胞突触结构。这些结果显示, 雷帕霉素具有抗氧化作用, 并对STZ诱导的HT22细胞损伤具有神经保护作用。

PSD 95是突触和神经发育过程中必不可少的支架蛋白, 在介导和整合突触信号传递^[12]、维持突触结构和功能^[13]中发挥重要作用。PSD 95本身并不具有蛋白酶活性, 但可以通过PDZ结构域与NMDA受体结合^[14], 同时PSD 95还能结合其他信号分子, 使它们与NMDA受体串集在一起, 从而组织和介导NMDA受体的信号级联反应^[15]。NMDA受体主要分布在中枢神经系统中, 能够调节神经元的树突、轴突结构发育及参与突触可塑性的形成, 其在海马组织中的相对表达含量和活性变化对记忆相关的长时程增强(long-term potentiation, LTP)和长时程抑制(long-term depression, LTD)有很大影响, 这可能是导致学习记忆损伤的原因之一^[16-17], NMDA的异常表达被认为与突触功能障碍有关^[18]。因此, 本实验检测了PSD 95、NR2B、NR1蛋白的表达情况, 发现STZ能显著下调HT22细胞PSD 95、NR2B、NR1蛋白的表达量, 诱导神经细胞发生突触功能障碍, 而雷帕霉素预保护则会显著增加PSD 95、NR2B和NR1蛋白的表达量, 从而保护神经细胞的树突结构和突触功能。

AMPK是细胞内重要的能量传感器, 其激活可促进产生能量的分解代谢并且抑制消耗能量的合成代谢, 在超过90%的AD脑中发现了AMPK的异常表达^[19]。研究表明, AMPK的激活能通过修复线粒体功能障碍改善STZ诱导的AD大鼠病理变化^[20]。激活AMPK能抑制mTOR信号转导活性, 诱导细胞自噬, 清除A β 等错误折叠蛋白质的致病性聚集体^[21]。此外, 海马组织中的mTOR可以通过激活下游通路调控PSD 95等突触可塑性相关蛋白质的合成, 维持突触蛋白稳态^[22-23]。越来越多的证据表明, AMPK和mTOR是关键的营养指标和细胞生长调节剂, 它们的失调与许多疾病密切相关^[24]。本研究发现, 当抑制AMPK蛋白的表达时, mTOR被激活, PSD 95、NR2B和NR1蛋白表达异常, 而雷帕霉素通过激活p-AMPK、抑制p-mTOR的表达逆转了STZ诱导的突触蛋白表达下调, 显著提高了PSD 95、NR2B和NR1蛋白的表达量, 增强了突触可塑性, 改善了神经元细胞突触损伤。

综上所述, STZ能损伤HT22细胞并降低其突触相关蛋白的表达量; 雷帕霉素能通过抑制氧化应激和凋亡保护STZ诱导的HT22细胞活性, 改善神经细胞的突触可塑性, 其机制可能与AMPK/mTOR通路调控突触蛋白PSD 95和NMDA受体活性、维持突触稳态有关。但本研究仅为离体实验, 还需从动物实验等多层面对雷帕霉素保护神经细胞的机制进行进一步的探讨。

参考文献 (References)

- [1] OBOUDIYAT C, GLAZER H, SEIFAN A, et al. Alzheimer's disease [J]. Semin Neurol, 2013, 33(4): 313-29.
- [2] LIN Y, SHAN P Y, JIANG W J, et al. Subjective cognitive de-

- cline: preclinical manifestation of Alzheimer's disease [J]. *Neurol Sci*, 2019, 40(1): 41-9.
- [3] SHARMA M, GUPTA Y K. Intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats produces both oxidative stress in the brain and cognitive impairment [J]. *Life Sci*, 2001, 68(9): 1021-9.
- [4] PARK J, WON J, SEO J, et al. Streptozotocin induces Alzheimer's disease-like pathology in hippocampal neuronal cells via CDK5/Drp1-mediated mitochondrial fragmentation [J]. *Front Cell Neurosci*, 2020, 14: 235.
- [5] YATES S C, ZAFAR A, HUBBARD P, et al. Dysfunction of the mTOR pathway is a risk factor for Alzheimer's disease [J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2013, 1: 3.
- [6] SUN Q, WEI L L, ZHANG M, et al. Rapamycin inhibits activation of AMPK-mTOR signaling pathway-induced Alzheimer's disease lesion in hippocampus of rats with type 2 diabetes mellitus [J]. *Int J Neurosci*, 2019, 129(2): 179-88.
- [7] QUERFURTH H, LEE H K. Mammalian/mechanistic target of rapamycin (mTOR) complexes in neurodegeneration [J]. *Mol Neurodegener*, 2021, 16(1): 44.
- [8] HOFMEIJER J, VAN PUTTEN M J. Ischemic cerebral damage: an appraisal of synaptic failure [J]. *Stroke*, 2012, 43(2): 607-15.
- [9] MECCA A P, O'DELL R S, SHARP E S, et al. Synaptic density and cognitive performance in Alzheimer's disease: a PET imaging study with [¹¹C]UCB-J [J]. *Alzheimers Dement*, 2022, doi: 10.1002/alz.12582.
- [10] OVERK C R, MASLIAH E. Pathogenesis of synaptic degeneration in Alzheimer's disease and Lewy body disease [J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 88(4): 508-16.
- [11] KRSTIC D, KNUESEL I. Deciphering the mechanism underlying late-onset Alzheimer disease [J]. *Nat Rev Neurol*, 2013, 9(1): 25-34.
- [12] COLEY A A, GAO W J. PSD95: a synaptic protein implicated in schizophrenia or autism [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2018, 82: 187-94.
- [13] HAN M, BAN J J, BAE J S, et al. UV irradiation to mouse skin decreases hippocampal neurogenesis and synaptic protein expression via HPA axis activation [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 15574.
- [14] KORNAU H C, SCHENKER L T, KENNEDY M B, et al. Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95 [J]. *Science*, 1995, 269(5231): 1737-40.
- [15] HARAGUCHI K, SATOH K, YANAI H, et al. The hDLG-associated protein DAP interacts with dynein light chain and neuronal nitric oxide synthase [J]. *Genes Cells*, 2000, 5(11): 905-11.
- [16] FARINA F R, COMMINS S. Hippocampal and prefrontal contributions to memory retrieval: examination of immediate early gene, NMDA receptor and environmental interactions [J]. *Eur J Neurosci*, 2020, 52(3): 2982-94.
- [17] BERBERICH S, PUNNAKKAL P, JENSEN V, et al. Lack of NMDA receptor subtype selectivity for hippocampal long-term potentiation [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(29): 6907-10.
- [18] MOTA S I, FERREIRA I L, REGO A C. Dysfunctional synapse in Alzheimer's disease: a focus on NMDA receptors [J]. *Neuropharmacology*, 2014, 76: 16-26.
- [19] SUN Q, WEI L L, ZHANG M, et al. Rapamycin inhibits activation of AMPK-mTOR signaling pathway-induced Alzheimer's disease lesion in hippocampus of rats with type 2 diabetes mellitus [J]. *Int J Neurosci*, 2019, 129(2): 179-88.
- [20] DU L L, CHAI D M, ZHAO L N, et al. AMPK activation ameliorates Alzheimer's disease-like pathology and spatial memory impairment in a streptozotocin-induced Alzheimer's disease model in rats [J]. *J Alzheimers Dis*, 2015, 43(3): 775-84.
- [21] CAI Z, CHEN G, HE W, et al. Activation of mTOR: a culprit of Alzheimer's disease [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2015, 11: 1015-30.
- [22] LEE C C, HUANG C C, WU M Y, et al. Insulin stimulates postsynaptic density-95 protein translation via the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(18): 18543-50.
- [23] OH J Y, KIM Y K, KIM S N, et al. Acupuncture modulates stress response by the mTOR signaling pathway in a rat post-traumatic stress disorder model [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 11864.
- [24] INOKI K, KIM J, GUAN K L. AMPK and Mtor in cellular energy homeostasis and drug targets [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2012, 52: 381-400.