DOI：10.12287/j.issn.2096-8965.20220211

·论　著·

高血糖通过AMPK/SIRT1调控CDK5通路介导阿尔兹海默症样分子病理改变

蔡宏斌[1]，赛心洁[2]，姚敏[2]，党文慧[3]，胡志林[2]，李鸣明[1]，李自超[1]，葛朝明[1]*

（1. 兰州大学第二医院，甘肃 兰州 730030；
2. 兰州大学第二临床医学院，甘肃 兰州 730000；
3. 甘肃柑青宁生物医学研究院，甘肃 兰州 730030）

【摘要】目的 阐明高血糖诱导对阿尔兹海默症（Alzheimer's Disease，AD）样病理改变的潜在分子机制。**方法** 选取18周龄的Sprague Dawley（SD）大鼠30只，将其随机分为对照组（Control）、模型组（STZ+HFD）以及模型+AMPK激动剂AICAR（5-Aminoimidazole-4-carboxamide1-β-D-ribofuranoside）组（STZ+HFD+AICAR），每组均为10只大鼠。模型组在高脂饮食（High-Fat Diet，HFD）喂养的基础上，经腹腔注射的方式给予大鼠50 mg/kg链脲佐菌素（Streptozotocin，STZ）建立2型糖尿病（Type Ⅱ Diabetes Mellitus，T2MD）/高血糖模型，STZ+HFD+AICAR组另给予大鼠100 mg/kg的AICAR，Control组给予常规饲料喂养并给予等量的柠檬酸钠缓冲液腹腔注射作为对照。8周内连续测量大鼠空腹血糖，8周后对各组大鼠进行糖耐量检测。通过Morris水迷宫实验分析各组大鼠认知功能的变化。采用Western Blot方法检测三个实验组大鼠脑组织AMPK/SIRT1通路分子、CDK5和H3acK9的表达变化。脑组织免疫组织化学染色检测AD特征性分子病理蛋白MAPT/Tau的磷酸化活性。**结果** 与Control组相比，8周高脂喂养联合STZ注射3天后，大鼠空腹血糖于第2周开始升高直至第8周（$P<0.05$），且8周后糖耐量显著受损（$P<0.05$），血清胰岛素水平显著升高（$P<0.01$）。STZ+HFD大鼠的水迷宫定位航行试验逃避潜伏时间明显延长（$P<0.05$），而水迷宫空间探索时间显著降低（$P<0.05$）。Western Blot结果显示，与Control组相比，STZ+HFD大鼠脑组织磷酸化的AMPK蛋白以及SIRT1蛋白的表达水平显著降低，而H3acK9和CDK5蛋白表达水平显著升高。脑组织免疫组织化学结果显示，Tau蛋白磷酸化水平显著升高。AICAR可部分改善脑组织分子病理改变，如：增加磷酸化AMPK蛋白以及SIRT1蛋白的表达，减少H3acK9和CDK5蛋白表达，进而降低Tau蛋白磷酸化水平。**结论** AMPK/SIRT1通路失活促进去乙酰化蛋白H3acK9及CDK5的表达，进而引起Tau蛋白活性增加，该机制是高血糖引起脑组织AD样分子病理改变的潜在机制之一 。

【关键词】阿尔兹海默病；高血糖；AMPK；SIRT1；CDK5；H3acK9

中图分类号：R749.1+5，R363.2+1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**2096-8965（2022）02-0082-10

Hyperglycemia promotes Alzheimer's disease-like pathological changes by upregulating the CDK5 expression through AMPK/SIRT1 action

Cai Hongbin[1], Sai Xinjie[2], Yao Min[2], Dang Wenhui[3], Hu Zhilin[2], Li Mingming[1], Li Zichao[1], Ge Zhaoming[1]*

(1. Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730030, Gansu, China;
2. Second Clinical Medical College of Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu, China;
3. Gansu Ganqingning Biomedical Research Institute, Lanzhou 730030, Gansu, China)

收稿日期：2022-03-01；**修回日期：**2022-04-27

基金项目：甘肃省自然科学基金项目（20JR10RA719）；兰州市人才创新创业项目（2020-RC-87）；甘肃省神经内科临床医学研究中心开放课题（20JR10FA663）

通讯作者：葛朝明（1963-），男，甘肃陇南人，博士生导师，主要从事脑血管病方面的研究。E-mail：gzm0701@yeah.net

【**Abstract**】**Objective** This study aims to elucidate the underlying mechanism of hyperglycemia induced Alzheimer's disease (AD)-like pathological changes. **Methods** Thirty Sprague Dawley rats (aged 18 weeks) were randomly divided into one control groups and two experimental groups (*n*=10 for each group), including control group, STZ+HFD group, and STZ+HFD+AICAR group. Control rats (*n*=10) was fed with the standard diet and experimental rats (n=20) was fed with high fat diet (HFD) for 8 weeks. 8 weeks after feeding, we estimated the reliability of the experimental model by measuring blood glucose levels (each week) of rats, serum insulin concentrations and oral glucose tolerance test (OGTT) test. Then experimental rats were injected with 50 mg/kg/day Streptozotocin (STZ) intraperitoneally for three days, whereas the control rats were given the same dose of citric acid buffer for comparison. Morris water maze tests was performed to observe the functional changes of brain regions related to spatial learning and memory in each group. Western blot was performed to detect the abundances of AMPK, p-AMPK, SIRT1, H3acK9 and CDK5 in rats. Immunohistochemistry staining was performed to evaluate the levels of MAPT/Tau which can reflect the AD-like pathological changes. Furthermore, AMPK agonist (AICAR) was used to assess whether AMPK/SIRT1 pathway, which participate in the AD-like pathological changes, is the upstream molecules of H3acK9 and CDK5. **Results** We found treatment with HFD and STZ significantly increased blood glucose and serum insulin levels, and impaired glucose tolerance in rats. Hyperglycemia led to a decrease in the activity of AMPK and expression of SIRT1. The expression levels of underlying molecules of AMPK including H3acK9 and CDK5 significantly increased. The levels of phosphorylated Tau significantly increased in brain tissues. Additonally, AICAR administration partial reversed hyperglycemia-induced AD-like molecular pathologic changes through activating AMPK/SIRT1, decreasing expression of H3acK9 and CDK5, and inhibiting Tau protein hyperphosphorylation in rat brain tissues. **Conclusion** Hyperglycemia induces inactivation of AMPK/SIRT1 pathway which promotes excessive deacetylation of H3K9 and over expression of CDK5, these changes in turn lead to Tau protein hyperphosphorylation and AD-like molecular pathologic changes.

【**Keywords**】Alzheimer's disease; Hyperglycemia; AMPK; SIRT1; CDK5; H3acK9

糖尿病（Diabetes Mellitus，DM）和阿尔茨海默病（Alzheimer Disease，AD）的患病率均逐年增长[1, 2]。近年来，AD被认为是2型糖尿病（Type Ⅱ Diabetes Mellitus，T2DM）的并发症之一，由于起病隐匿，发病机制不明，给临床上早期病因的识别带来诸多困难[3]。流行病学证据表明，DM使AD发病风险增加，合并DM和AD的患者具有更高的残疾率和病死率，由此推测两者可能具有相近或共同的分子病理机制[4]。最新的研究揭示了DM和AD在分子层面的联系，AD的危险因素并不局限于中枢神经系统，还包括全身代谢异常，例如：高血糖可损伤糖代谢途径中的某些关键酶，这些酶涉及AD早期阶段的免疫应答过程[5]。更重要的是，脑或胰腺组织胞外β淀粉样蛋白（β-Amyloid Peptide，Aβ）和胰淀素（Amylin）的沉积及胞内Tau蛋白过度磷酸化被证实是MD和AD共有的分子病理特征，该机制与表观遗传修饰调控的基因表达及转录密切相关[6]。因此，高糖引起的代谢异常与AD的联系为研究两者共同的分子病理机制提供了重要的线索。我们前期通过对高脂饮食（High-Fat diet，HFD）大鼠模型研究发现，CDK5启动子区域H3乙酰化和甲基化异常是糖尿病所引起的AD样病理改变的下游分子机制[7]。调控H3K9乙酰化水平可下调CDK5表达，进而可改善糖尿病大鼠海马神经元Tau蛋白过度磷酸化及认知功能[8]。然而，目前尚缺乏上游调控的分子机制。以往的研究表明，AMPK/SIRT1信号是糖代谢的重要信号通路，高糖可抑制AMPK功能，AMPK与CDK5分子在AD发病机制中具有密切的联系[9-11]。结合先前的工作我们设想，高血糖很可能通过抑制AMPK/SIRT1功能，增加乙酰化蛋白H3acK9所调控的CDK5的蛋白表达，介导DM相关AD样分子病理改变。激动AMPK/SIRT1信号通路可通过调控上述下游分子的表达，部分逆转DM相关AD样分子病理特征。于此，我们通过构建动物模型和分子生物学方法，来验证我们的设想，同时为揭示DM并发AD以及两者之间关系的代谢机

制提供线索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

30只18周龄的雄性SD大鼠购自斯贝福（北京）生物技术有限公司，许可证号：SCXK（京）2019-0010，由兰州大学实验动物中心饲养。大鼠在正式实验前，在SPF级动物饲养中心饲养1周，以适应环境。本研究中所涉及的动物实验按照动物实验标准操作规程进行，实验项目计划经兰州大学第二医院伦理委员会及相应主管部门批准。

1.1.2 实验试剂

60% kcal高脂饲料（D12492）购买于Research Diets公司；10% kcal常规饲料（D12450H）均购买于美国Research Development International（RDI）公司；STZ（ST1668）购买于北京碧云天公司；柠檬酸钠缓冲液（ml29954-1）购自上海酶连公司；血糖试纸条和血糖仪均购买于美国罗氏公司；50%葡萄糖注射液（国药准字H42022230）购买于武汉市福星生物药业股份有限公司；兔抗AMPK一抗（ab32047）、兔抗p-AMPK一抗（EPR5683）、鼠抗SIRT1一抗（ab110304）、兔抗CDK5一抗（ab40773）、兔抗H3acK9一抗（ab109446）和兔抗β-Actin一抗（ab181602）均购买于美国Abcam公司，山羊抗兔辣根酶标记二抗（ZB-2301）和山羊抗鼠辣根酶标记二抗（ZB-2305）均购买于中杉金桥公司。RIPA蛋白裂解液（HR0259）购买于中国百奥莱博公司；BCA蛋白浓度测定试剂盒（20201ES76）和ECL化学发光超敏显色试剂盒（36208ES60）均购买于上海翊圣公司；大鼠胰岛素ELISA试剂盒（SP12622）购买于武汉赛培生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 构建T2MD大鼠模型

30只SD大鼠随机分为3组，分别为对照组（Control）、模型组（STZ+HFD）和模型+AMPK激动剂AICAR（5-Aminoimidazole-4-carboxamide1-β-D-ribofuranoside）组（STZ+HFD+AICAR），每组10只大鼠。STZ+HFD和STZ+HFD+AICAR组大鼠给予60% kcal高脂饮食饲养，Control组给予10% kcal常规饲料进行喂养。2个月后，先对大鼠禁食6 h，给予经高脂饲料喂养的20只大鼠50 mg/kg的STZ（用0.1 mol/L且pH值为4.4的柠檬酸钠缓冲液配置）腹腔注射，Control组给予等量的柠檬酸钠缓冲液腹腔注射作为对照，每天注射一次，共注射3次，5天后随机测量SD大鼠血糖，若经高脂饲料喂养的每只大鼠血糖值均≥13.9 mmol/L，则认定T2MD大鼠模型构建成功。

T2MD模型经验证构建成功后，以腹腔注射的方式给予STZ+HFD+AICAR组10只大鼠AICAR（100 mg/kg），每天注射一次，连续注射3天。

1.2.2 大鼠血糖检测

空腹血糖检测前让大鼠禁食8 h，然后取尾静脉血滴于血糖试纸条上，并用罗氏血糖检测仪进行检测；随机血糖检测前不禁食，随机取尾静脉血滴于血糖试纸条上并用罗氏血糖检测仪进行检测。

1.2.3 大鼠葡萄糖耐量实验

实验前大鼠禁食12 h，尾静脉取0 h血，测血糖，以2 mL/kg的剂量用50%葡萄糖溶液给大鼠灌胃，并于灌胃后分别在20 min、60 min和120 min时间点取尾静脉血，用血糖仪检测不同时间点血糖并绘制曲线。

1.2.4 大鼠血清胰岛素检测

大鼠采血前禁食12 h，测定空腹血清胰岛素水平。眼眶取血，收集血液后，1 000×g离心10 min将血清和红细胞分离，移液器吸取上清备检。采用ELISA的方法检测血清胰岛素水平。根据酶标仪所测得的结果，用标准品绘制标准曲线，并根据标准曲线计算各样本胰岛素浓度（pg/mL）。具体实验操作流程依照ELISA试剂盒中说明书提供的方法。

1.2.5 Morris水迷宫实验

建立T2DM模型后进行Morris水迷宫试验，连续进行5天，前3天为训练期，第4天为定位航行试验，第5天为空间探索试验。训练方法：在水迷宫均分的四个象限中依次将大鼠头面向水迷宫壁放入水中，并引导未在120 s内找到平台的大鼠爬上平台，强化记忆。定位航行试验：记录大鼠从投放入水至找到并爬上平台所需时间。若120 s未找到平台，则记录潜伏期为120 s。空间探索试验：移走水迷宫内平台，记录大鼠在120 s内穿越平台次数、有效区停留时间、有效区运动距离。每只鼠每次测量重复三次。

1.2.6 生物信息学分析高糖诱导AD样分子病理改变相关蛋白通路

我们利用String网站（https://cn.string-db.org/）

提供的线上工具分析AMPK/PRKAB1、SIRT1、MAPT/Tau和CDK5所构成的蛋白-蛋白网络图（PPI network），同时进行生物过程以及KEGG信号通路富集分析。为进一步的分子生物学实验提供参考。

1.2.7 Western Blot实验

水迷宫实验结束后颈椎脱臼处死大鼠，并取出大鼠的脑组织。将脑组织进行研磨，离心后收集细胞，用RIPA裂解液提取大鼠脑组织中的总蛋白，并用BCA法进行蛋白浓度的测定。按照15 μg的上样量将蛋白与5×Loading buffer混匀，并在100℃金属浴变性，变性后以80 V跑30 min，120 V直至loading buffer跑出凝胶结束电泳，然后以300 mA、1 h的条件将其转移到甲醇激活后的PVDF膜上，后用3% BSA封闭1 h。AMPK（1∶1000）、p-AMPK（1∶1000）、SIRT1（1∶1000）、CDK5（1∶1000）、H3acK9（1∶1000），p-Tau（1:1000）和β-Actin（1∶1000）抗体在4℃孵育过夜，第二天用TBS-T洗3次膜，10 min/次，然后用对应的二抗孵育PVDF膜，1 h后用TBST洗3次膜，10 min/次。最后，使用ECL检测本研究中相关蛋白的表达情况，磷酸化的AMPK蛋白以总AMPK蛋白表达水平为参照，其余蛋白表达水平以GAPDH的表达作为内参。

1.2.8 免疫组织化学法（Immunohistochemistry，IHC）检测脑组织Tau磷酸化水平

IHC染色检测脑组织中AD特征性分Tau磷酸化水平。60℃下加热石蜡包埋切片2 h，二甲苯中脱蜡15 min梯度乙醇将切片水合。3%过氧化氢抑制内源性过氧化物酶活性，采用血清阻断非特异位点。进行抗原回收，然后制备的组织切片，在4℃下与一抗（抗Tau磷酸化抗体1:1000）孵育过夜，切片在TBS中洗涤，并与HRP标记的山羊抗IgG二抗（1:1000）孵育。组织切片分别用100 μL 3，3′-二氨基联苯胺溶液和苏木精染色。最后，在光学显微镜下观察切片，并用Image J软件进行分析。

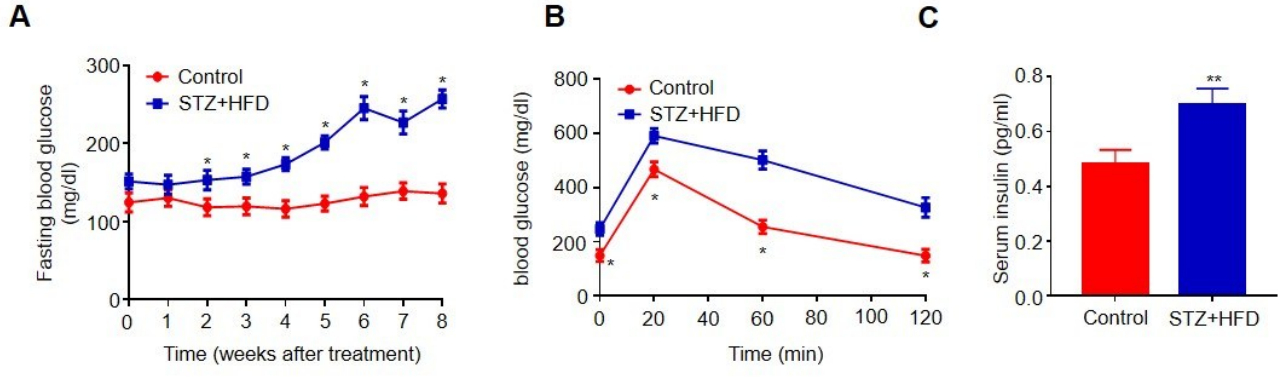
1.2.9 统计方法

统计采用SPSS 20.0软件包进行统计学分析，方法采用单因素方差分析，组间比较采用配对t检验或独立样本t检验，计数资料以均值±标准差表示，P<0.05代表计算结果具有统计学意义。

2 结果

2.1 高脂饲料喂养联合STZ腹腔注射显著引起大鼠糖代谢异常

空腹血糖检测结果显示，与常规饲料喂养的Control大鼠（n=10）相比，高脂饲养大鼠血糖水平自第2周开始显著高于对照组（P<0.05）直至第8周（见图1A）。葡萄糖糖耐量实验结果表明，糖负荷前高脂饲料喂养联合STZ腹腔注射大鼠空腹基础血糖水平显著高于Control大鼠（P<0.05），在葡萄糖负荷后20 min（P<0.05）、60 min（P<0.05）、120 min（P<0.05）等时间点血糖水平均高于Control大鼠（P<0.05），反映模型构建成功，模型大鼠葡萄糖糖耐量明显受损（见图1B）。与对照组相比，糖负荷前高脂饲料喂养联合STZ腹腔注射大鼠空腹血清胰岛素水平显著高于Control大鼠（P<0.01）（见图1C）。

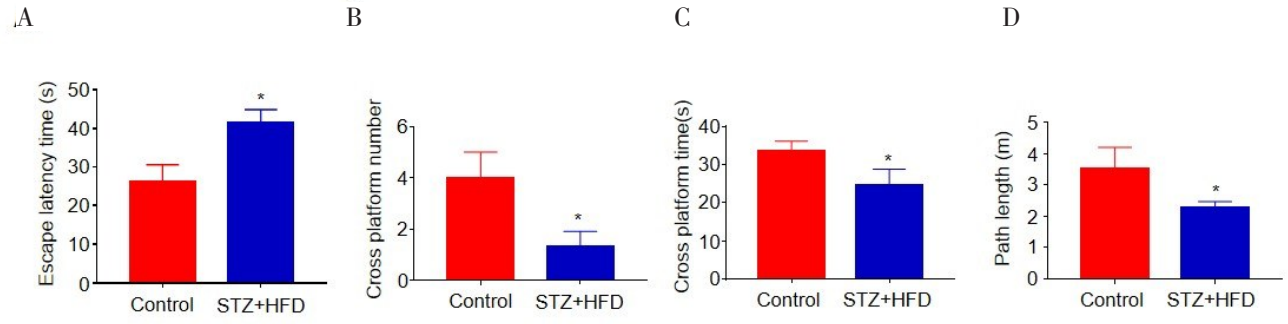


（A）0至8周空腹血糖水平；（B）糖耐量实验，大鼠空腹12 h，首先测定基线血糖水平，继而以浓度为50%的葡萄糖2 mL/kg灌胃，采用血糖仪分别在30 min、60 min、120 min等时间点测定大鼠尾静脉学葡萄糖浓度（pg/mL）；（C）空腹血清胰岛素水平。统计学方法采用单因素方差分析和配对t检验，$^{*}P$<0.05，$^{**}P$<0.01。Control为对照组，STZ+HDF为高脂饮食联合STZ注射。

图1 高脂饲料喂养联合STZ腹腔注射显著引起大鼠糖代谢异常

2.2 高血糖影响大鼠的认知功能

Morris水迷宫实验结果显示，STZ+HFD组大鼠的水迷宫定位航行试验逃避潜伏时间明显高于Control组（P<0.05）（见图2A）；STZ+HFD组大鼠的穿越平台次数、有效区停留时间、有效区运动距离均低于Control组（P<0.05）（见图2B-D）。

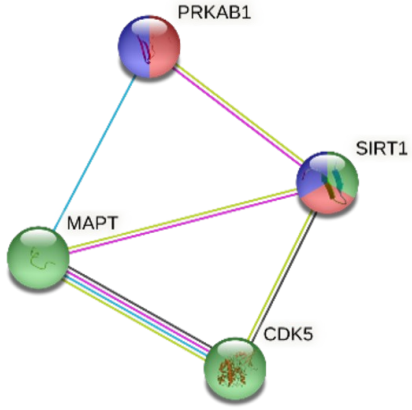


（A）水迷宫定位航行试验逃避潜伏时间；（B）大鼠的穿越平台次数；（C）有效区停留时间；（D）有效区运动距离，每只鼠每次测量重复三次。统计学方法采用配对t检验或独立样本t检验，*P<0.05。Control为对照组，STZ+HDF为高脂饮食联合STZ注射。

图2 高血糖降低大鼠的认知功能

2.3 生物信息学分析结果

生物信息学分析结果提示，AMPK、SIRT1、MAPT/Tau和CDK5等分子之间存在网络关系（见图3）。生物过程和KEGG通路与神经元死亡调节，AMPK信号通路以及高糖相关的胰高血糖素信号通路密切相关（见表1、表2）。结合现有的证据，这些分子之间具有潜在调控关系。



绿色代表GO:0010506：神经元死亡调节（Regulation of neuron death）；红色代表KEGG-hsa04152：AMPK信号通路（AMPK signaling pathway）；蓝色代表hsa04922：胰高血糖素信号通路（Glucagon signaling pathway）；MAPT为微管相关蛋白Tau（Microtubule Associated Protein Tau；URL：https://www.genecards.org/）；PRKAB1为蛋白激酶AMP激活的非催化亚单位β1（Protein Kinase AMP-Activated Non-Catalytic Subunit Beta 1；URL：https://www.genecards.org/）。

图3 String网站生物信息学分析

表1 生物过程（基因本体）富集区

GO-Term	Description	Count	Strength	FDR
GO:0016241	Regulation of autophagy	4	1.76	0.0012
GO:1901796	Regulation of macroautophagy	3	1.93	0.0186
GO:0010506	Regulation of neuron death	3	1.67	0.0367*
GO:1901214	Regulation of signal transduction by p53 class mediator	3	1.91	0.0186

FDR=False Discovery Rate；*本实验涉及的生物过程

表2 KEGG通路富集区

Pathway	Description	Count	Strength	FDR
hsa04068	FoxO signaling pathway	2	1.89	0.0205
hsa04152	AMPK signaling pathway	2	1.91	0.0205*
hsa04211	Longevity regulating pathway	2	2.05	0.0205
hsa04213	Longevity regulating pathway - multiple species	2	2.21	0.0205
hsa04922	Glucagon signaling pathway	2	1.99	0.0205*

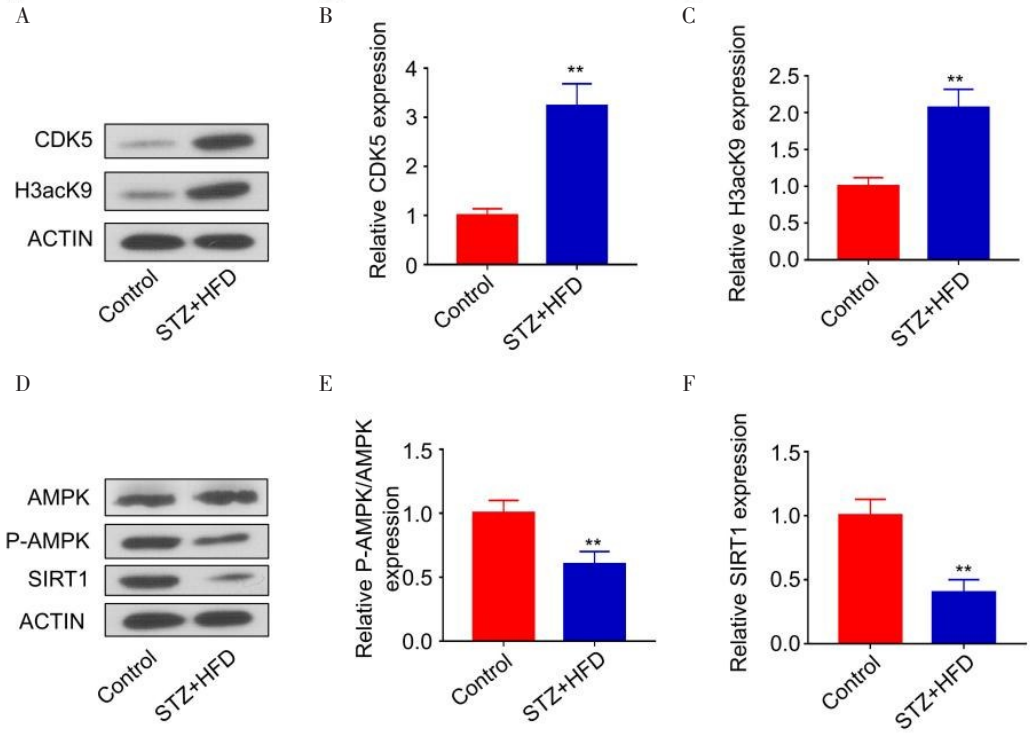
FDR=False Discovery Rate；*本实验涉及的生物过程

2.4 高血糖上调大鼠脑组织中CDK5和H3acK9的表达水平

Western Blot结果发现，STZ+HFD组大鼠脑组织中的CDK5和H3acK9的表达水平显著高于Control组（P<0.05）（见图4A-C），而p-AMPK/AMPK和SIRT1的表达水平则明显降低（P<0.05）（见图4D-F）。以上结果提示，高血糖可能通过AMPK/SIRT1通路影响大鼠脑组织中CDK5和H3acK9的表达水平。

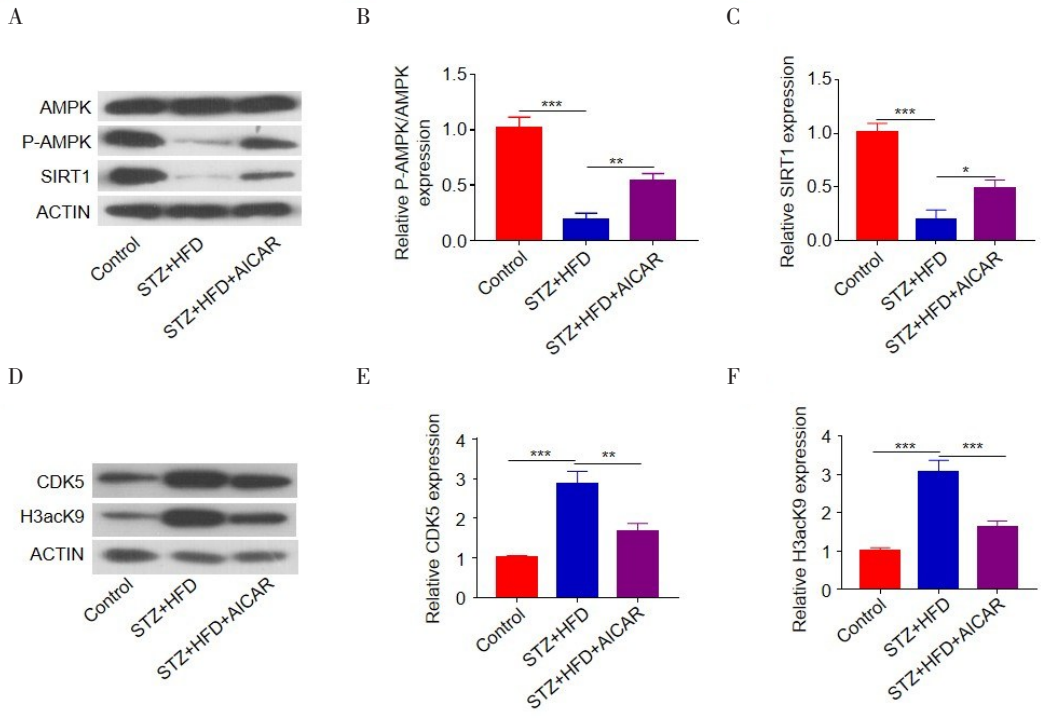
2.5 高血糖通过调控AMPK/SIRT1通路上调CDK5和H3acK9的表达

AMPK激动剂AICAR干预STZ+HFD大鼠，结果显示，与Control组相比，STZ+HFD组大鼠脑组织中p-AMPK和SIRT1的表达水平明显降低，而CDK5和H3acK9的表达水平显著提高（P<0.05）；与未干预STZ+HFD组相比，STZ+HFD+AICAR组大鼠脑组织中的p-AMPK和SIRT1的表达水平显著升高，而CDK5和H3acK9的表达水平明显降低（P<0.05）（见图5）。以上结果提示，高血糖可能通过抑制AMPK/SIRT1通路活性上调CDK5和H3acK9的表达。由于AMPK/SIRT1是级联反应通路，有研究证实，AMPK活化可通过SIRT1激活下游分子[10]。因此，我们应用AICAR增加了AMPK活性后，SIRT1蛋白表达上调，进而抑制H3acK9和CDK5蛋白表达。



（A和D）CDK5、H3acK9、总AMPK、p-AMPK、SIRT1以及ACTIN蛋白印迹；（B）CDK5蛋白表达相对丰度；（C）H3acK9蛋白表达相对丰度；（E）p-磷酸化的AMPK蛋白/总AMPK蛋白比值；（F）SIRT1蛋白表达相对丰度。统计学方法采用配对t检验或独立样本t检验，$^{*}P$<0.05，$^{**}P$<0.01。Control为对照组，STZ+HDF为高脂饮食联合STZ注射。

图4 高血糖对大鼠脑组织中AMPK/SIRT1通路、CDK5和H3acK9的调控作用



（A和D）总AMPK、p-AMPK、SIRT1、CDK5、H3acK9以及ACTIN蛋白印迹；（B）p-磷酸化的AMPK蛋白/总AMPK蛋白比值；（C）SIRT1蛋白表达相对丰度；（E）CDK5蛋白表达相对丰度；（F）H3acK9蛋白表达相对丰度。统计学方法采用单因素方差分析，配对t检验或独立样本t检验，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$。Control为对照组，STZ+HDF为高脂饮食联合STZ注射，STZ+HDF为高脂饮食联合STZ注射成模后给予AICAR（100 mg/kg），每日注射，连续三天。

图5　高血糖可能通过AMPK/SIRT1通路上调CDK5和H3acK9的表达

2.6 高血糖通过调控AMPK/SIRT1通路抑制磷酸化MAPT/Tau蛋白表达

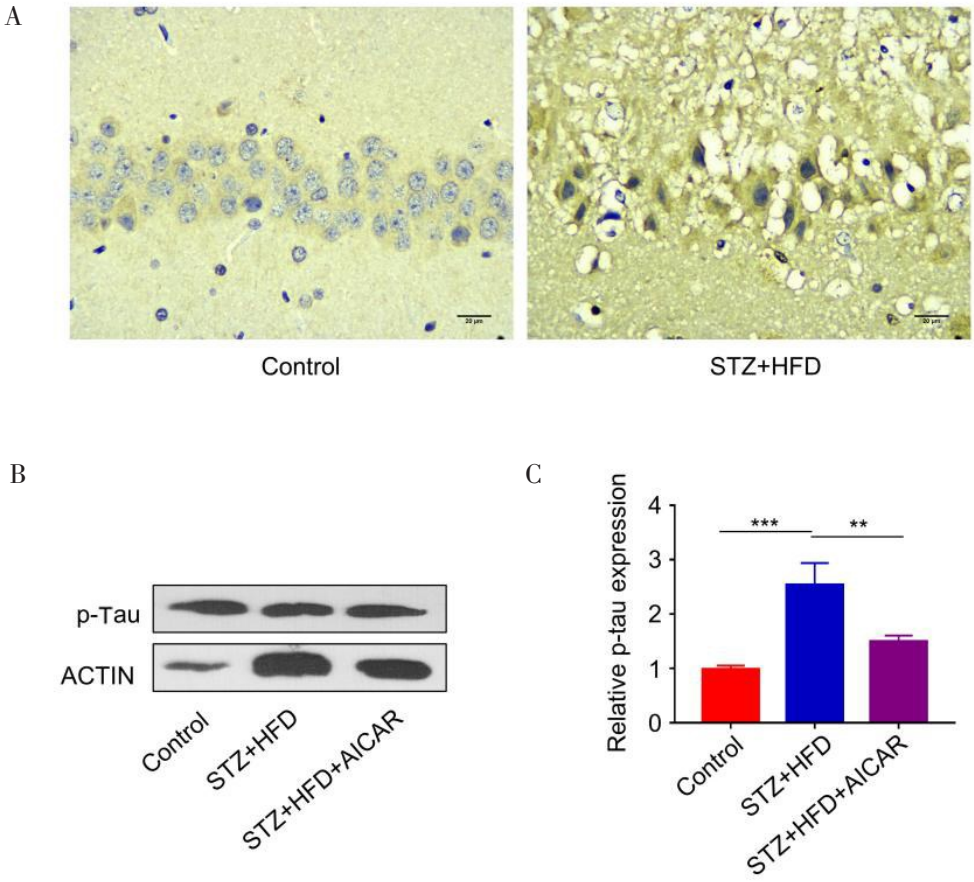
研究表明，Tau的高磷酸化水平为糖代谢紊乱相关神经元病变和AD的共同分子病理特征[6,8]。因此，为在当前模型中对上述观点进行验证，我们通过预实验对高糖模型脑组织进行磷酸化的Tau蛋白免疫组织化学染色观察。发现与对照组相比，高糖可引起脑组织Tau蛋白过渡磷酸化（见图6A）。该结果提示，高糖可诱导脑组织AD样分子病理改变。

MAPT也称为微管相关蛋白Tau，目前已被证实是AD的特征性分子病理改变[12]。我们也通过前期的实验证实Tau蛋白为H3acK9-CDK5的下游分子，其表达受H3acK9-CDK5的调控[7,8]。因此，本实验进一步检测磷酸化Tau蛋白的表达，结果显示，T2MD模型大鼠脑组织磷酸化Tau蛋白表达显著高于对照组（$P<0.05$），而AICAR可降低脑组织磷酸化Tau蛋白的表达（$P<0.05$），部分逆转高糖模型所引起的特征性分子病理改变（见图6B-C）。

3　结论

近年来的研究证实，DM、肥胖、癌症和神经退行性疾病之间在生理病理学方面均涉及代谢异常，这些研究发现DM与AD之间的关系尤为密切。然而，两者共有的调控机制尚未被完全揭示[13,14]。因此，明确DM和AD发生发展相关的调控机制，对降低AD发病率以及揭示新的治疗靶点十分必要。

DM和AD的发病机制和疾病进展涉及许多共同的分子调控网络。研究发现，AMPK是一种调节能量平衡和糖脂代谢的生物分子，在DM和AD疾病进程中均发挥重要的作用[15,16]。AMPK的活性与糖异生密切相关，不仅受糖异生上游激酶肝激酶B1（Liver Kinase B1，LKB1）、转化生长因子β-活化激酶1（Transforming Growth Factor Beta-Activated Kinase 1，TAK1）和钙调素依赖蛋白激酶β（Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Kinase β，CaMKKβ）的调控[17]，还影响糖异生下游葡萄糖6-磷酸酶（Glucose-6-phosphatase，G-6-pase）和磷酸烯醇丙酮酸羧激酶（Phosphoenolpyruvate Carboxykinase，PEPCK）。AMPK可通过影响糖异生的过程，进而改善DM[17]。此外，AMPK还可通过促进葡萄糖转运蛋白4（Glucose Transporter 4，GLUT4）的表达和膜转运活性，调节游离脂肪酸的



（A）Tau蛋白磷酸化水平的脑组织免疫组织化学检测，与Control组相比高糖引起脑组织Tau蛋白磷酸化水平升高，脑组织磷酸化的Tau蛋白深染（标尺：20 μm）。（B）磷酸化Tau蛋白脑组织Western Blot检测；（C）统计图。统计学方法采用单因素方差分析，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$。Control为对照组，STZ+HDF为高脂饮食联合STZ注射，STZ+HDF+AICAR为高脂饮食联合STZ注射成模后给予AMPK激动剂AICAR（100 mg/kg），每日注射，连续三天。

图6　高糖诱导脑组织Tau蛋白过渡磷酸化，而AMPK激动剂通过调控AMPK/SIRT1通路抑制磷酸化Tau蛋白表达

释放，改善胰岛素抵抗[18]。在AD中，AMPK不仅可以通过β-分泌酶减少Aβ沉积，还可通过SIRT1和蛋白磷酸酶2A（Protcin Plaosphatasc 2A，PP2A）减少Tau蛋白的过度磷酸化，从而改善脑能量代谢进一步调控认知功能[19]。多项研究结果证实，AMPK/SIRT1通路在促进细胞存活、线粒体生物生成、抑制炎症和凋亡、刺激抗氧化剂合成、调控血糖等方面发挥着不可或缺的作用[20-22]。由此可见，AMPK/SIRT1通路可能是DM和AD之间的桥梁。

CDK5是细胞周期蛋白依赖性激酶家族的重要成员，在AD疾病进程中发挥了重要的调控作用，可能是连接DM和AD的主要病理生理调节分子。CDK5失调能够干扰淀粉样蛋白前体（Amyloid Precursor Protein，APP）的蛋白水解过程，并通过影响三种称为α-、β-和γ-分泌酶的酶来调节Aβ[23]。鉴于APP衍生的Aβ沉积是众多AD致病假说的共同点，明确CDK5在AD疾病进程中的调控机制十分重要。我们前期的研究发现，CDK5启动子区域H3乙酰化和甲基化异常可以促使糖尿病发展成为AD样分子病理改变。通过调控H3K9乙酰化水平可下调CDK5表达，从而改善糖尿病大鼠海马神经元Tau蛋白过度磷酸化及认知功能障碍[7,8]。为了进一步完善DM和AD之间的共同分子调控网络，我们在此探讨高血糖状态下AMPK/SIRT1通路对CDK5的调控作用，及其对大鼠认知功能的影响。

本实验的模型设计先采用高脂饲料喂养大鼠8周，在此基础上短期给予大鼠STZ腹腔注射的方式破坏部分胰岛β细胞，预先的高脂饲料喂养可介导胰岛素抵抗，血清胰岛素水平升高，而短期STZ注射破坏部分胰岛β细胞可引起胰岛素在整体水平上的相对缺乏，因此我们检测到高血糖、糖耐量的降低以及血清胰岛素水平升高等T2MD的主要改变，

该模型符合T2MD的特征。

本研究表明，STZ+HFD组大鼠的水迷宫定位航行试验逃避潜伏时间明显延长，而STZ+HFD组大鼠的穿越平台次数、有效区停留时间、有效区运动距离均低于Control组，提示高血糖状态下大鼠的认知功能受损。接着我们通过Western Blot实验发现，STZ+HFD组大鼠脑组织中p-AMPK和SIRT1的表达水平明显降低，而CDK5和H3acK9的表达水平显著提高，AD特征性分子病理标志物Tau蛋白表达增加。结合既往研究的证据考虑，这些蛋白表达的变化均可出现在MD以及AD的病理生理过程中。因此，我们考虑高糖可诱导AD样分子病理特征性改变，促进AD的发生及发展。我们进一步研究发现，AMPK激动剂AICAR可通过促进STZ+HFD对大鼠脑组织中的AMPK活性和SIRT1蛋白表达，降低H3acK9和CDK5的表达，因此可以证实AMPK/SIRT1为H3acK9和CDK5的上游信号分子。另外，AICAR干预可下调AD特征分子Tau蛋白磷酸化的表达水平，而我们先前的工作已经发现乙酰化的H3K9蛋白-H3acK9可通过调控CDK5的表达，进而调控Tau的表达，AMPK又为H3acK9和CDK5的上游分子，所以AMPK/SIRT1对Tau表达的调控部分是通过H3acK9-CDK5实现的。上述研究结果提示，高血糖通过诱导AMPK/SIRT1通路失活，上调CDK5和H3acK9的表达，促进AD标志分子Tau的表达，该途径是糖尿病引起AD样神经系统改变潜在机制之一。

综上所述，本研究观察到高血糖能够导致AMPK/SIRT1通路失活，使H3K9过度去乙酰化，进而诱导CDK5活化后Tau蛋白过度磷酸化，最终导致AD样分子病理改变，这可为高血糖伴随的AD提供药物分子靶点，进行精准分子治疗。

参 考 文 献

[1] SCHELTENS P, DE TROOPER B, KIVIPELTO M, et al. Alzheimer's disease[J]. Lancet, 2021, 397(10284): 1577-1590.

[2] CHOUDHURY A A, DEVI RAJESWAR V. Gestational diabetes mellitus - a metabolic and reproductive disorder[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 143: 112183.

[3] BURILLO J, MARQUES P, JIMENEZ B, et al. Insulin resistance and diabetes mellitus in Alzheimer's disease[J]. Cells, 2021, 10(5): 1236.

[4] DINIZ PEREIRA J, GOMES FRAGA V, MORAI SANTOS A L, et al. Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus: a systematic review of proteomic studies[J]. J Neurochem, 2021, 156(6): 753-776.

[5] KASSAAR O, PEREIRA MORAIS M, XU S, et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor is subjected to glucose modification and oxidation in Alzheimer's Disease [J]. Scientific Reports, 2017, 7: 42874.

[6] ROJAS M, CHAVEZ-CASTILLO M, BAUTISTA J, et al. Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus: pathophysiologic and pharmacotherapeutics links[J]. World J Diabetes, 2021, 12(6): 745-766.

[7] CAI H, FAN Z, TIAN T, et al. Diabetes-induced H3K9 hyeracetylation promotes development of Alzheimer's disease through CDK5[J]. J Alzheimer's Dis, 2020, 77(1): 75-84.

[8] CAI H, FAN Z, TIAN T, et al. Epigenetic control of CDK5 promoter regulates diabetes-associated development of Alzheimer's disease[J]. J Alzheimer's Dis, 2019, 69(3): 743-750.

[9] JIANG P, REN L, ZHI L, et al. Negative regulation of AMPK signaling by high glucose via E3 ubiquitin ligase MG53[J]. Molecular cell, 2021, 81(3): 629-637.e5.

[10] JIANG X, CHEN J, ZHANG C, et al. The protective effect of FGF21 on diabetes-induced male germ cell apoptosis is associated with up-regulated testicular AKT and AMPK/Sirt1/PGC-1α signaling[J]. Endocrinology, 2015, 156(3): 1156-1170.

[11] LI M, CAI N, GU L, et al. Genipin attenuates Tau phosphorylation and Aβ levels in cellular models of Alzheimer's disease[J]. Molecular Neurobiology, 2021, 58 (8): 4134-4144.

[12] FENG Q, LUO Y., ZHANG X N, et al. MAPT/Tau accumulation represses autophagy flux by disrupting IST1-regulated ESCRT-III complex formation: a vicious cycle in Alzheimer neurodegeneration[J]. Autophagy, 2020, 16(4): 641-658.

[13] HE Z, YOU G, LIU Q, et al. Alzheimer's disease and diabetes mellitus in comparison: The therapeutic efficacy of the vanadium compound[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(21): 11931.

[14] HOBDA A L, PARMAR M S. The link between diabetes mellitus and tau hyperphosphorylation: implications for risk of Alzheimer's disease[J]. Cureus, 2021, 13(9): e18362.

[15] BARONE E, DI DOMENICO F, PERLUIGI M, et al. The interplay among oxidative stress, brain insulin resistance

and AMPK dysfunction contribute to neurodegeneration in type 2 diabetes and Alzheimer disease[J]. Free Radic Biol Med, 2021, 176: 16-33.

[16] GUPTA S, SINGH V, GANESH S, et al. siRNA mediated GSK3beta knockdown targets insulin signaling pathway and rescues Alzheimer's disease pathology: Evidence from in vitro and in vivo studies[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2022, 14(1): 69-93.

[17] CHEN M, HUANG N, LIU J, et al. AMPK: a bridge between diabetes mellitus and Alzheimer's disease[J]. Rehav Brain Res, 2021, 400: 113043.

[18] THABAH D, SYIEM D, PAKYNTEIN C L, et al. Potentilla fulgens upregulate GLUT4, AMPK, AKT and insulin in alloxan-induced diabetic mice: an in vivo and in silico study[J]. Arch Physiol Biochem, 2021, 18: 1-13.

[19] ABD El-FATAH I M, ABDELRAZEK H M A, IBRAHIM S M, et al. Dimethyl fumarate abridged tauo-/amyloidopathy in a D-Galactose/ovariectomy-induced Alzheimer's-like disease: modulation of AMPK/SIRT-1, AKT/CREB/BDNF, AKT/GSK-3beta, adiponectin/Adipo1R, and NF-kappaB/IL-1beta/ROS trajectories[J]. Neurochem Int, 2021, 148: 105082.

[20] THIRUPATHI A, DE SOUZA C T. Multi-regulatory network of ROS: the interconnection of ROS, PGC-1 alpha, and AMPK-SIRT1 during exercise[J]. J Physiol Biochem, 2017, 73(4): 487-494.

[21] HUANG J, WANG X, ZHU Y, et al. Exercise activates lysosomal function in the brain through AMPK-SIRT1-TFEB pathway[J]. CNS Neurosci Ther, 2019, 25(6): 796-807.

[22] LI F, CHEN Y, LI Y, et al. Geniposide alleviates diabetic nephropathy of mice through AMPK/SIRT1/NF-kappaB pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2020, 886: 173449.

[23] LU T T, WAN C, YANG W, et al. Role of Cdk5 in amyloid-beta pathology of Alzheimer's Disease[J]. Curr Alzheimer Res, 2019, 16(13): 1206-1215.

（上接第81页）

al. The effects of vitamin d supplementation on muscle function among postmenopausal women: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. EXCLI J, 2019, 18: 591-603.

[45] LEE M, CHANG E B. Inflammatory bowel diseases (IBD) and the microbiome-searching the crime scene for clues[J]. Gastroenterology, 2021, 160(2): 524-537.

[46] DE SIRE R, RIZZATTI G, INGRAVALLE F, et al. Skeletal muscle-gut axis: emerging mechanisms of sarcopenia for intestinal and extra intestinal diseases[J]. Minerva Gastroenterol Dietol, 2018, 64(4): 351-362.

[47] BUIGUES C, FERNANDEZ-GARRIDO J, PRUIMBOOM L, et al. Effect of a prebiotic formulation on frailty syndrome: a randomized, double-blind clinical trial[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(6): 932.

[48] MUNUKKA E, RINTALA A, TOIVONEN R, et al. Faecalibacterium prausnitzii treatment improves hepatic health and reduces adipose tissue inflammation in high-fat fed mice[J]. ISME J, 2017, 11(7): 1667-1679.

[49] BALESTRIERI P, RIBOLSI M, GUARINO M, et al. Nutritional aspects in inflammatory bowel diseases[J]. Nutrients, 2020, 12(2): 372.

[50] ECKERT K G, ABBASI-NEUREITHER I, KOPPEL M, et al. Structured physical activity interventions as a complementary therapy for patients with inflammatory bowel disease - a scoping review and practical implications[J]. BMC Gastroenterol, 2019, 19(1): 115.

[51] SUBRAMANIAM K, FALLON K, RUUT T, et al. Infliximab reverses inflammatory muscle wasting (sarcopenia) in crohn's disease[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2015, 41(5): 419-428.

[52] EL H C, FARES S, CHARDIGNY J M, et al. Vitamin D supplementation and muscle strength in pre-sarcopenic elderly lebanese people: a randomized controlled trial[J]. Arch Osteoporos, 2018, 14(1): 4.

[53] BATTISTINI C, BALLAN R, HERKENHOFF M E, et al. Vitamin D modulates intestinal microbiota in inflammatory bowel diseases[J]. Int J Mol Sci, 2020, 22 (1): 362.

[54] KOBAYASHI T, SIEGMUND B, LE BERRE C, et al. Ulcerative colitis[J]. Nat Rev Dis Primers, 2020, 6(1): 74.