

敲除大鼠 PDK1 基因对大鼠行为、认知功能以及 tau 蛋白的影响

李超生, 唐健, 胡玲玲, 赵继来, 范长燕, 睢晨燕

无锡市第三人民医院神经内科, 江苏 无锡 214041

摘要: **目的** 探讨条件性敲除 3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1 (PDK1) 基因对大鼠行为、认知功能及微管相关蛋白 tau 的影响,为阿尔茨海默病(AD)发病机制的研究提供参考。**方法** 选取 SD 大鼠 90 只,随机分为三组(每组 30 只):模型组大鼠采用 Cre-loxP 技术条件性敲除 PDK1 基因;阳性对照组大鼠采用 Cre-loxP 技术条件敲除大鼠 PDK1 基因之后,构建载有 PDK1 基因的慢病毒质粒 LV-PDK1,并将 PDK1 基因重新敲入;阴性对照组不作处理。比较三组大鼠 3、5、8 月龄时各组运动能力及认知功能。采用 Morris 水迷宫观察和评价大鼠学习记忆及运动能力的改变;采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测三组大鼠 3、5、8 月龄时脑脊液中磷酸化 tau 蛋白(P-tau)的含量;8 月龄时处死大鼠取脑组织,采用 Western blot 法检测 tau 蛋白在 Ser396、Ser199/202、Thr205 三个位点的磷酸化水平(P-tau 蛋白相对表达水平)。**结果** (1)Morris 水迷宫检测结果:在 3、5、8 月龄时,模型组大鼠运动能力及认知水平逐渐降低,且明显低于阴性、阳性对照组($P < 0.05$)。(2)ELISA 检测结果:在 8 月龄时,模型组脑脊液中 P-tau 蛋白浓度较 3、5 月龄时明显升高($P < 0.05$),且各月龄时 P-tau 蛋白含量均明显高于阴性、阳性对照组($P < 0.05$)。(3)Western blot 法检测结果:模型组脑组织中 tau 蛋白在 Ser396、Ser199/202 二个位点的磷酸化水平均高于阴性、阳性对照组($P < 0.05$),在 Thr205 位点三组间磷酸化水平相近($P > 0.05$)。**结论** PDK1 基因可能参与了 tau 蛋白在 Ser396、Ser199/202 二个位点磷酸化水平的调控,并通过 P-tau 蛋白的调控,影响大鼠运动能力及认知水平。tau 蛋白磷酸化水平高低与大鼠运动能力及认知水平有一定相关性,可能与 AD 的发病机制有关。

关键词: 3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1; 基因; 条件敲除; 微管相关蛋白 tau; 阿尔茨海默病

中图分类号: R-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2017)10-1306-05

Influence of PDK1 gene knockout on behavior, cognitive function and tau protein in rats

LI Chao-sheng, TANG Jian, HU Ling-ling, ZHAO Ji-lai, FAN Chang-yan, SUI Chen-yan

Department of Neurology, The Third People's Hospital of Wuxi, Wuxi, Jiangsu 214041, China

Corresponding author: TANG Jian, E-mail: tangjian1028@126.com

Abstract: Objective To explore the effect of conditional knockout of 3-phosphoinositide dependent protein kinase 1 (PDK1) gene on behavior, cognitive function and microtubule-associated protein- tau protein in rats to provide a reference for studying the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD). **Methods** Ninety SD rats were randomly divided into three groups ($n = 30$ each): model group (PDK1 gene of rats was knocked-out by Cre-loxP technique), positive control group (after PDK1 gene of rats was knocked out by Cre-loxP technique, lentiviral plasmid LV-PDK1 containing PDK1 gene was constructed, and then the PDK1 gene was knocked-in again) and negative control group (without any treatment). The motor ability and cognitive function at 3-, 5- and 8- month old rats were compared among three groups. Morris water maze was used to observe and evaluate the changes of learning, memory and motor ability in rats. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the content of phosphorylated tau protein (P-tau) in cerebrospinal fluid at 3-, 5- and 8- month old rats in three groups. All rats were killed at 8 months old, and brain tissues were taken. Western blot method was used to detect the phosphorylation level of tau protein (relative expression level of P-tau) at loci Ser396, Ser199/202 and Thr205. **Results** The motor ability and cognitive level at 3-, 5- and 8- month old rats in model group gradually decreased and were significantly lower than those in the same period of both negative and positive control group (all $P < 0.05$). In the same

time, P-tau protein content in model group was significantly higher than those in negative and positive control group (all $P < 0.05$), and the concentration of P-tau protein at 8 months old in model group was significantly higher than those at 3 and 5 months old (all $P < 0.05$). The phosphorylation level of tau protein at Ser396 and Ser199/202 foci in model group were significantly higher than those in negative and positive control group (all $P < 0.05$), while there was no significant difference in Thr205 focus between three groups ($P > 0.05$). **Conclusions** PDK1 gene may be involved in the regulation of the phosphorylation level of tau protein at Ser396 and Ser199/202 foci in rats and affects the motor ability and cognitive level of rats through regulating P-tau protein. The phosphorylation level of tau protein is associated with motor ability and cognitive level, which may be related to the pathogenesis of AD.

Key words: 3-phosphoinositide dependent protein kinase 1; Gene; Conditional knockout; Microtubule-associated protein, tau protein; Alzheimer's disease

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 的发病率逐年提高, 3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1 (3-phosphoinositide dependent protein kinase 1, PDK1) 是 AGC 蛋白激酶家族中的激酶之一, 也是维持生长发育的必需因子, 在促进代谢中意义重大, 同时也维持正常的脑发育和脑功能, PDK1 的缺失可能是导致 AD 发生的因素之一, PDK1 首先在胰岛素信号转导中被发现, 它通过依赖磷脂酰肌醇 3, 4, 5-三磷酸介导的方式激活蛋白激酶 B 苏氨酸残基 308^[1]。构成 PDK1 的结构包括两个 PH 结构域 (pleckstrin homology domain), 通过受体偶联, 有效激活其下游偶联的 Akt 通路以及激酶, 起到维持细胞体积和保持机体细胞的敏感状态, 该种结构构象可与第二信使 PIP3 特异性结合, 还有一个名为 PIF 袋的结合以达到上述作用, 有效激活 Akt, 控制细胞生长、分化、生存、功能的维持、蛋白质翻译和葡萄糖代谢。由此可见 PDK1 是众多促生长信号通路发生的关键环节^[2]。

AD 的发生与微管相关蛋白 tau (microtubule-associated protein tau) 的过度磷酸化关系密切, tau 蛋白是细胞中含量最高的微管相关蛋白, 对于细胞内功能状态起着维持和促进作用, 广泛存在于神经细胞中, 对机体神经功能的维持至关重要。Tau 蛋白基因有 16 个外显子, 通过不同的信使 RNA 的转录和修饰可变形为不同的亚型结构^[3-4]。不同 tau 蛋白亚型其存在的磷酸化位点有所不同, 而 AD 的主要发生过程就是 tau 蛋白过度磷酸化的过程, 由于磷酸化位点的激活, tau 蛋白的过度磷酸化, 丧失原有功能, 其病理变化是在整个大脑的联合皮质和边缘系统中, 大量神经元发生退行性变, 继而出现 A β 蛋白沉积现象以及神经原纤维缠结 (NFTs) 形成, tau 蛋白聚合的能力低下, 失去正常微管结构, 微管功能也随之下落, 最终造成神经元的变性损伤功能障碍^[5]。本研究将从 PDK1 的缺失对 AD 发生的影响及其与 tau 蛋白的相关性方面入手, 探究 AD 发生的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂 条件性基因敲除大鼠模型, 慢病毒 (lentiviral viruses, LV) 质粒 LV-PDK1 构建及打靶策略、同源重组、基因型鉴定和嵌合体大鼠育种主要与上海赫尔生物研究中心协作完成, 动物使用许可证号为 SYXK (沪) 2009-0007。CaMKIIa-Cre-PDK1f/f 大鼠购自上海赫尔生物研究中心, 其他动物实验均在无锡史莱克动物中心完成, 实验动物使用管理委员会批准实验。大鼠的饲养和繁殖与上海赫尔生物研究中心合作定制获得 CaMKIIa-Cre-PDK1f/f 大鼠。置于 SPF 级动物房饲养, 室温控制在 25 °C 左右, 湿度 60% 左右, 鼠笼以及食物均经紫外线照射处理, 饮水高温高压灭菌。生物素化抗兔 IgG 抗体购自北京鼎国公司, 兔抗鼠 ptau-Ser396、ptau-Ser199/202、ptau-Thr205 单抗、 β -actin 抗体 ELISA Kit 酶联免疫试剂盒购自美国 Santa Cruz biotechnology (无锡区域代理), 蛋白上样缓冲 SDS-PAGE 液凝胶配制试剂盒化学发光试剂盒—ECL 全蛋白抽提试剂盒苯甲基磺酰氟 (PMSF) 购自碧云天生物技术, PVDF 膜购自德国 MC, 蛋白浓度测定试剂盒—BCA 购自上海 Beyotime。

1.2 实验动物分组 选取 SD 大鼠 90 只, 随机分为三组 (每组 30 只): 模型组大鼠采用 Cre-loxP 技术条件敲除大鼠 PDK1 基因; 阳性对照组大鼠采用 Cre-loxP 技术条件敲除大鼠 PDK1 基因之后, 构建载有 PDK1 基因的慢病毒质粒 LV-PDK1, 并将 PDK1 基因重新敲入; 阴性对照组则不作处理。同组大鼠生长到 3、5、8 月龄时进行实验, 8 月龄后断头取脑。

1.3 实验方法

1.3.1 Morris 水迷宫实验 采用 Morris 水迷宫法对大鼠认知功能进行评估。水迷宫选用适宜大鼠的通用圆形, 迷宫直径 10 cm, 高 40 cm, 水深 25 cm, 水温适宜, 水中加入着色剂使液体呈不透明状, 在水池壁的边沿均匀安置 4 个性状各异的标记, 通过标记将水池等分为四个象限, 并做标记, 选定一个象限, 在该区

域正中放置平台,高度略低于水面,刚好站立而不能通过肉眼看见,并且没入水下 3 cm,迷宫外全封闭,参照物不变。游动定位试验,将受试大鼠从不同象限依次放入水中,记录从入水开始到寻找平台的时间(逃避潜伏期),如果大鼠在 2 min 内找到平台,则记录实际数据,超过 2 min 记录为 2,并且由实验者将其引上平台并停留。空间定位运动试验上述实验全部结束后,第二日撤去平台,然后在相同的象限选择相同的人水点将大鼠平稳置于水中,在 2 min 内记录大鼠游过原有平台位置的次数,以判断大鼠记忆储存及提取再现能力,同时记录大鼠在各象限停游动的距离,判断大鼠运动能力的高低。

1.3.2 酶联免疫吸附试验(ELISA)检查脑脊液中磷酸化 tau 蛋白(P-tau 蛋白)表达 腰椎穿刺获得大鼠脑脊液,收集 1 ml 脑脊液,于低温冰箱保存,测定脑脊液中的 tau 蛋白浓度,应用 Innogenetics 公司所生产的生物诊断试剂(Innotest hTau;Innotest 抗人 Tau 试剂盒),严格按照说明书操作。在 1 ml 脑脊液标本以 1:1 比例加入单克隆抗人 P-tau 蛋白抗体,用抗人的 tau 蛋白单克隆抗体包被(将所用抗原用包被稀释液稀释到适当浓度),检测时采用 1:50~1:400 的稀释度,选取较大稀释体积进行,一般保证样品吸取量=50 μ l。将稀释好的样品加入酶标反应孔中,每样品至少加双孔,每孔 100 μ l,过夜孵育,在不同浓度中以重组 P-tau 蛋白作为标准,洗脱后,应用过氧化共扼的抗蛋白链菌素孵育,用 4 氨基联苯作为色原体,在分光光度计波长 450 nm 处读数,可见 tau 蛋白免疫反应,用 Lowry 法计算样本 P-tau 蛋白含量。

1.3.3 Western blot 法检测 P-tau 蛋白的表达 于 8 月龄实验结束时将大鼠断头取脑,提取脑组织蛋白:剪下头部,快速将枕骨周围的肌肉修剪掉,然后用血管钳撬开枕骨,然后小心的撬开两侧顶骨,用弯镊从脑的两侧分离一下,然后从前端将脑掀起,分离脑组织,研磨,提取组织蛋白。主要试剂配置方法,配制十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)10%分离胶:蒸馏水 2.7 ml,30% Acr-Bis 3.3 ml,1M Tris(pH 8.8)3.8 ml,10% SDS 0.1 ml,10% AP 0.1 ml,TEMED 0.004 ml。配制 SDS-PAGE 5%浓缩胶:蒸馏水 4.1 ml,30% Acr-Bis 1.0 ml,1MTris(pH 8.8)0.75 ml,10% SDS 0.06 ml,10% AP 0.06 ml,TEMED 0.006 ml。配制电泳缓冲液,蛋白电泳,取干净的玻璃板固定好置于制胶架;配制 10 ml 下层胶,待下层胶凝固,弃去上层无水乙醇,再配置 4 ml 上层胶,插入梳子,避免气泡,等胶凝固后放入电泳槽中,

加适量电泳液,将各组蛋白及 Marker 用微量加样器加入各泳道,先用 80 V 电压,待上样缓冲液运动至上层胶与下层胶分界线时,将电压升至 100 V。待胶条中的蛋白 Marker 的各条带彻底分离时,终止电泳。继续转膜,依据 Marker 切取目的蛋白胶段,置于电转液中,通过 6 层滤纸和 PVDF 膜,按照黑色板→滤纸 3 层→胶段→PVDF 膜→滤纸 3 层→海绵→白板的顺序依次转膜,调节电流为 250 mA,转膜约 60 min。转膜完毕后,将膜放入 TBS 液中清洗,浸泡封闭液中。抗体稀释比例(1:1 000),孵育一抗以及二抗。之后将膜放入成像仪中,加入适量的发光液,进行曝光拍照,图片采用 Quantity One 软件进行灰度值分析,用目的蛋白的灰度值与 β -actin 灰度值的比值表示目的蛋白相对表达水平。

1.4 统计学分析 实验数据采用统计软件 SPSS 19.0,GraphPad Prism 进行处理。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用三因素三水平方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。检验水准取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 水迷宫实验 在定位航行试验中,在 3、5、8 月龄时,模型组大鼠找到平台的潜伏期较阴性对照组、阳性对照组大鼠延长(P 均 <0.05);且 8 月龄时找到平台的潜伏期较 3、5 月龄延长(P 均 <0.05);阴性对照组、阳性对照组不同月龄大鼠间找到平台的潜伏期相当(P 均 >0.05)。见表 1。在空间探索实验中,模型组大鼠各月龄时穿越平台的次数分别少于阴性对照组、阳性对照组大鼠(P 均 <0.05);每组不同月龄大鼠间穿越平台的次数无统计学差异(P 均 >0.05)。见表 2。模型组大鼠各月龄时 2 min 内在水迷宫中的运动距离分别短于阴性对照组、阳性对照组大鼠(P 均 <0.05);每组不同月龄大鼠间运动距离无统计学差异(P 均 >0.05)。见表 3。

2.2 ELISA 方法检测 ELISA 检测大鼠脑脊液结果显示,阴性对照组、阳性对照组分别与模型组相比,在 3、5、8 月龄时 P-tau 蛋白浓度明显减少(P 均 <0.05);模型组在 8 月龄时 P-tau 蛋白浓度较 3、5 月龄时明显升高(P 均 <0.05)。见表 4、图 1。

2.3 Western blot 法检测 Western blot 法对 P-tau 蛋白表达水平的检测结果显示,模型组大鼠脑组织中 tau 蛋白在 Ser396、Ser199/202 二个位点的磷酸化水平平均高于阴性对照组、阳性对照组(P 均 <0.05),在 Thr205 位点磷酸化水平三组间差异不明显($P > 0.05$)。见图 2。

表 1 各组不同月龄大鼠的逃避潜伏期 (n = 30, s, $\bar{x} \pm s$)

组别	3 月龄	5 月龄	8 月龄
模型组	61.01 ± 9.89 [#]	62.12 ± 9.12 [#]	81.78 ± 9.84
阳性对照组	36.29 ± 5.25 [*]	34.34 ± 7.28 [*]	41.16 ± 4.57 [*]
阴性对照组	33.23 ± 4.63 [*]	38.34 ± 7.28 [*]	39.50 ± 5.57 [*]

注:与模型组比较, *P < 0.05; 与同组 8 月龄比较, [#]P < 0.05。

表 2 各组不同月龄大鼠在目标象限穿越平台的次数

(n = 30, 次数, $\bar{x} \pm s$)

组别	3 月龄	5 月龄	8 月龄
模型组	8.03 ± 1.89	6.12 ± 2.12	7.78 ± 2.84
阳性对照组	17.29 ± 3.14 [*]	16.34 ± 3.28 [*]	18.16 ± 3.57 [*]
阴性对照组	17.51 ± 2.34 [*]	17.29 ± 4.12 [*]	15.21 ± 3.54 [*]

注:与模型组比较, *P < 0.05。

表 3 各组不同月龄大鼠 2 min 内在水迷宫中的运动距离

(n = 30, cm, $\bar{x} \pm s$)

组别	3 月龄	5 月龄	8 月龄
模型组	1153.03 ± 121.49	1212.12 ± 115.41	1201.68 ± 113.81
阳性对照组	1845.12 ± 211.51 [*]	1723.03 ± 191.39 [*]	1951.03 ± 181.49 [*]
阴性对照组	1713.03 ± 187.71 [*]	1615.52 ± 201.61 [*]	1824.15 ± 211.56 [*]

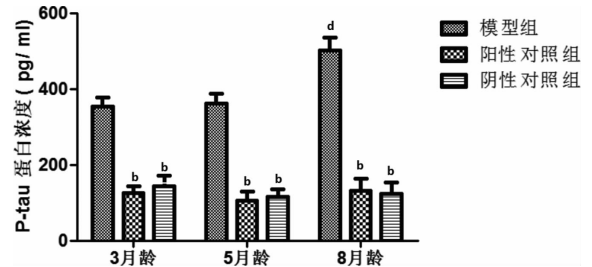
注:与模型组比较, *P < 0.05。

表 4 各组不同月龄大鼠脑脊液中 P-tau 蛋白浓度比较

(n = 30, pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

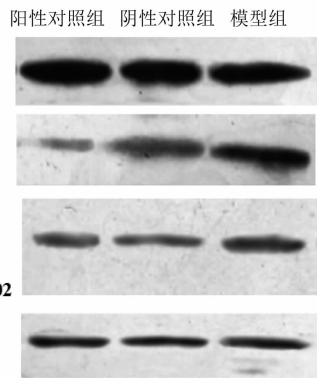
组别	3 月龄	5 月龄	8 月龄
模型组	353.41 ± 25.49 [#]	362.12 ± 25.40 [#]	501.68 ± 33.81
阳性对照组	125.15 ± 19.11 [*]	106.63 ± 22.67 [*]	131.63 ± 31.49 [*]
阴性对照组	143.73 ± 27.69 [*]	115.41 ± 19.72 [*]	124.55 ± 28.51 [*]

注:与模型组比较, *P < 0.05; 与同组 8 月龄比较, [#]P < 0.05。



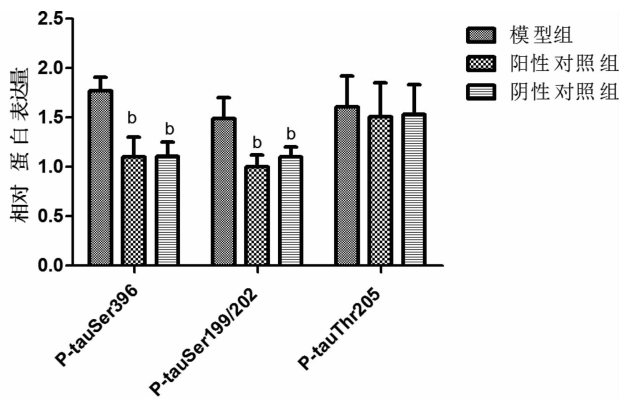
注:与模型组比较, ^bP < 0.05; 与同组 3、5 月龄比较, ^dP < 0.05。

图 1 ELISA 方法检测各组不同月龄大鼠脑脊液中 P-tau 蛋白浓度



注:2a:电泳图;2b:三组 tau 蛋白在磷酸化三个位点表达比较(与模型组比较, ^bP < 0.05)。

图 2 Western blot 检测各组脑组织中 tau 蛋白在 Ser396、Ser199/202、Thr205 三个磷酸化位点的表达变化



3 讨论

PDK1 由 556 个氨基酸构成,是 AGC 蛋白激酶家族中的一员,分子量为 63。其结构中具有激酶催化结构以及羧基端 PH 结构域,该种结构使得 PDK1 可以与特异性磷酸化位点结合并与底物磷酸化位点发生竞争性结合,从而替换该位点的 PDK1 与自身磷酸化疏水基团发生作用^[6],不仅如此,PDK1 还是脑发育和神经元生存的必需因子,起着维持正常脑发育和脑功能的重要的、不可或缺的作用;此外,PDK1 还可以选择诱导 γ -氨基丁酸能神经元的分化成熟,对神经元的代谢、生存、增殖、生长及功能的发挥起关键作用,如先天 PDK1 缺如可导致脑功能发育受限^[7]。PDK1 在体内作用十分广泛,很多信号通路的激活都与之有关。目前较为认可的是其偶联的 PI3K-Akt 下游信号通路,有研究者指出通过激活 PI3K-Akt 信号

通路,进一步使 P70、蛋白激酶 A(PKA)、蛋白激酶 B(PKC) β II 等蛋白发生磷酸化,从而介导它们的激活^[8]。而 PDK1 的缺失与 AD 的发生是否存在一定关系呢?已有文献发现去除 PDK1 以后,对其下游偶联的 PI3K 信号通路起到抑制的作用,通过该通路的抑制性作用影响皮质细胞大小、数目以及功能,起到负调控作用,PDK1 缺失最终导致了头小畸形^[7]。Liu 等^[9]的研究也报道,在 II 型糖尿病并发 AD 的患者中,脑组织中 PDK1 蛋白的表达水平相较于正常人显著减少,说明在 AD 的发生过程中,PDK1 可能参与了某一环节。目前比较认可的关于 AD 的发生主要是 tau 蛋白学说,该学说认为 tau 蛋白的高度磷酸化可能是导致 AD 的主要因素之一,由于位于突触联合部的 tau 蛋白高度磷酸化之后产生很强的神经毒性,尸检证明 AD 患者脑内的 tau 蛋白磷酸化水平明显升高^[10],对小鼠 AD 模型的研究也证明其脑内的 tau

蛋白磷酸化水平明显升高^[11]。Tau 蛋白是一种微管相关蛋白,正常情况下,tau 蛋白促进微管蛋白亚单位组装为微管蛋白,并使它们处于一个稳定的结构状态。Tau 蛋白可通过磷酸化来调节微管组装进程,但过度磷酸化的 tau 可以聚集形成密度过高的 NFTs,导致 AD 的发生及痴呆程度的进展^[12]。tau 蛋白磷酸化的上游通路不十分明确,但是从已有文献发现,与 tau 蛋白磷酸化有关激酶种类繁多,包括 Akt、PKA、CaMKII、GSK-3 β 及 cdk5 等,它们均可通过不同位点使 tau 蛋白发生磷酸化^[13-14],而过度磷酸化的 tau 蛋白则是最终形成 NFTs 结构的前提条件^[15]。之前已阐述过,PDK1 的下游通路之一就是 PI3K-Akt 信号通路,那么有理由相信,PDK1 的缺失可能导致了 PI3K-Akt 的活化,进一步通过某个特异性位点使 tau 蛋白过度磷酸化最终形成 NFTs,导致 AD 的发生。

本试验对模型组大鼠采用 Cre-loxP 技术条件敲除大鼠 PDK1 基因,通过 Morris 水迷宫对其学习记忆及运动能力的改变进行观察和评价,发现,模型组大鼠运动能力及认知水平 3、5、8 月龄时逐渐降低,同时期各组大鼠运动能力及认知水平比较,模型组均明显低于阴性/阳性对照组,说明敲除 PDK1 后大鼠的学习记忆及运动能力受到了明显影响,提示对于 AD 的发生 PDK1 起到了一定作用。而后用 ELISA 法检测三组大鼠 3、5、8 月龄时脑脊液 P-tau 蛋白的含量发现,模型组 8 月龄时 P-tau 蛋白含量较 3、5 月龄时显著增加;同月龄各组大鼠 tau 蛋白的含量模型组均明显高于阴性/阳性对照组,这说明 PDK1 的缺失导致了 P-tau 蛋白的含量增加,且有一定时间相关性,其具体发挥作用的通路可能是 PI3K-Akt 信号通路,这有待进一步实验证明。最后在 8 月龄时处死大鼠用 Western blot 法检测 tau 蛋白在 Ser396、Ser199/202、Thr205 三个位点的磷酸化水平发现,模型组 tau 蛋白在 Ser396、Ser199/202 二个位点的磷酸化水平均高于阴性对照组、阳性对照组;在 Thr205 位点磷酸化水平三组间差异无统计学意义,提示激活 tau 蛋白磷酸化过程的关键因素可能是特异性的激活了 Ser396、Ser199/202 二个位点,且与 Thr205 位点的关系不大。

综上所述,大鼠 PDK1 基因可能参与了 tau 蛋白在 Ser396、Ser199/202 二个位点的磷酸化水平的调控,并通过对 tau 蛋白的调控,影响大鼠运动能力及认知水平;大鼠 tau 蛋白磷酸化水平的高低与运动能力及认知水平有一定相关性,这可能与 AD 的发病机制有关。

参考文献

- [1] Biondi RM. Phosphoinositide-dependent protein kinase 1, a sensor of protein conformation[J]. Trends Biochem Sci, 2004, 29(3): 136.
- [2] Dunn EF, Connor JH. Dominant inhibition of Akt/protein kinase B signaling by the matrix protein of a negative-strand RNA virus[J]. J Virol, 2011, 85(1): 422 - 431.
- [3] Llorens-Martin M, Teixeira CM, Fuster-Matanzo A, et al. Tau isoform with three microtubule binding domains is a marker of new axons generated from the subgranular zone in the hippocampal dentate gyrus; implications for Alzheimer's disease [J]. J Alzheimers Dis, 2012, 29(4): 921 - 930.
- [4] Andreadis A, Brown WM, Kosik KS. Structure and novel exons of the human tau gene[J]. Biochemistry, 1992, 31(43): 10626 - 10633.
- [5] Bloom GS. Amyloid- β and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis[J]. JAMA Neurol, 2014, 71(4): 505 - 508.
- [6] Ivetac I, Munday AD, Kisseleva MV, et al. The type Ialpha inositol polyphosphate 4-phosphatase generates and terminates phosphoinositide 3-kinase signals on endosomes and the plasma membrane[J]. Mol Biol Cell, 2005, 16(5): 2218 - 2233.
- [7] Chalhouh N, Zhu G, Zhu X, et al. Cell type specificity of PI3K signaling in Pdk1- and Pten-deficient brains [J]. Genes Dev, 2009, 23(14): 1619 - 1624.
- [8] Belham C, Wu S, Avruch J. Intracellular signalling: PDK1--a kinase at the hub of things [J]. Curr Biol, 1999, 9(3): R93 - R96.
- [9] Liu Y, Liu F, Grundke-Iqbal I, et al. Deficient brain insulin signaling pathway in Alzheimer's disease and diabetes [J]. J Pathol, 2011, 225(1): 54 - 62.
- [10] Wang JZ, Xia YY, Grundke-Iqbal I, et al. Abnormal hyperphosphorylation of tau: sites, regulation, and molecular mechanism of neurofibrillary degeneration [J]. J Alzheimers Dis, 2013, 33 Suppl 1: S123 - S139.
- [11] Bukar Maina M, Al-Hilaly YK, Serpell LC. Nuclear Tau and Its Potential Role in Alzheimer's Disease [J]. Biomolecules, 2016, 6(1): 9.
- [12] Amemori T, Jendelova P, Ruzicka J, et al. Alzheimer's Disease: Mechanism and Approach to Cell Therapy [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(11): 26417 - 26451.
- [13] Ma DL, Chen FQ, Xu WJ, et al. Early intervention with glucagon-like peptide 1 analog liraglutide prevents tau hyperphosphorylation in diabetic db/db mice [J]. J Neurochem, 2015, 135(2): 301 - 308.
- [14] Xu W, Yang Y, Yuan G, et al. Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, reduces Alzheimer disease-associated tau hyperphosphorylation in the hippocampus of rats with type 2 diabetes [J]. J Investig Med, 2015, 63(2): 267 - 272.
- [15] Wang JZ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration [J]. Eur J Neurosci, 2007, 25(1): 59 - 68.

收稿日期: 2017-05-15 修回日期: 2017-06-20 编辑: 周永彬