

mTOR在有氧运动调节胰岛素抵抗小鼠海马内突触可塑相关蛋白表达中的作用分析*

李明明¹ 李静静¹ 刘蓓蓓^{1,2} 杨亚南¹ 刘冬梅¹ 姜淑杰^{1,3}

摘要

目的:探讨有氧运动对胰岛素抵抗小鼠海马内突触可塑相关蛋白表达的影响及可能的mTOR和自噬相关机制。

方法:6周龄C57BL/6J雄性小鼠适应性喂养1周后,随机分为普通对照组(C,n=12)和胰岛素抵抗模型组,分别进行普通饲料和高脂饲料喂养12周后,根据GTT、ITT结果判定胰岛素抵抗模型成功建立,并将该组小鼠随机分为胰岛素抵抗安静组(IR,n=10)、胰岛素抵抗+有氧运动组(AE,n=10)。AE组进行为期12周的递增速度跑台训练后,全部小鼠麻醉处死、取脑并剥离出海马组织,利用Western Blot技术检测小鼠海马内胰岛素信号通路,突触可塑、mTOR及自噬相关蛋白的表达情况。

结果:胰岛素抵抗小鼠海马内PSD95、SYN的表达及AKT、mTOR的磷酸化水平显著性下降,4EBP2的表达显著性升高。有氧运动可提高mTOR、Raptor、LC3II/LC3I、NMDAR、SYN的表达以及AKT、mTOR的磷酸化水平。

结论:有氧运动在提高胰岛素抵抗小鼠海马内PI3K/Akt信号通路活性的情况下,可通过激活mTORC1,进一步提高突触可塑相关蛋白NMDAR、SYN的表达。

关键词 胰岛素抵抗;海马;突触可塑相关蛋白;有氧运动;哺乳类动物雷帕霉素靶蛋白

中图分类号:R493,R587.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2019)-03-0255-07

The effect analysis of mTOR in the regulation of aerobic exercise on the expression of synaptic plasticity-related protein in the hippocampus of mice with insulin resistance/LI Mingming,LI Jingjing,LIU Beibei, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2019, 34(3): 255—261

Abstract

Objective: To investigate the effect of aerobic exercise on synaptic plasticity-related protein levels in the hippocampus of mice with insulin resistance and the possible mechanisms of mTOR and autophagy.

Method: 6-week-old male C57BL/6J mice were randomly divided into normal control group (C, n=12) and insulin resistance model group after a week of adjustable feeding. The mice were maintained for 12 weeks on either normal diet or high-fat diet respectively. According to the data from GTT and ITT to determine the successful establishment of the insulin resistance model. Then the mice with insulin resistance were randomly divided into insulin resistance + quiet group (IR, n=10) and insulin resistance + aerobic exercise group (AE, n = 10). Mice in group AE were performed a 12-week increasing speed treadmill training after being adapted to the treadmill for a week. After the intervention, the mice were sacrificed after anesthetized and the brains were collected to get the hippocampus tissue. Insulin signaling pathway, synaptic plasticity-related, mTOR-related and autophagy-related protein expression in the hippocampus of mice with insulin resistance were detected by western blotting.

Result: The expressions of PSD95, SYN and the activity of Akt, mTOR decreased significantly, while the ex-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2019.03.002

*基金项目:国家自然科学基金资助项目(81572241);上海体育学院“运动健身科技”省部共建教育部重点实验室

1 上海体育学院运动科学学院,上海,200438; 2 潍坊医学院临床医学院; 3 通讯作者

作者简介:李明明,女,硕士研究生; 收稿日期:2018-01-10

pression of 4EBP2 increased significantly in the hippocampus of mice with insulin resistance. Aerobic exercise can effectively improve the expression of mTOR, Raptor, LC3II/LC3I, NMDAR, SYN and the activity of Akt and mTOR.

Conclusion: Aerobic exercise can effectively improve the activity of PI3K/Akt signal pathway to active mTORC1, thus improve the expression of NMDAR and SYN in the hippocampus of mice with insulin resistance.

Author's address School of Kinesiology, Shanghai University of Sport, Shanghai, 200438

Key word insulin resistance; hippocampus; synaptic plasticity-related protein; aerobic exercise; mammalian target of rapamycin

越来越多的证据表明海马内磷脂酰肌醇3激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, PKB/Akt)信号通路在胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)引起认知功能下降中发挥重要作用。外周IR发生时,可通过降低海马内PI3K/Akt信号通路活性,进而损害海马神经元突触可塑性,影响学习和记忆功能^[1]。房国梁等^[2]研究已表明当海马内PI3K/Akt信号通路活性下降时,可通过激活糖原合酶激酶3 β (GSK3 β),进一步增加微管相关蛋白(Tau)的磷酸化水平来影响海马学习记忆功能。哺乳类动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)作为PI3K/Akt信号通路的重要下游靶蛋白,可通过调控真核生物起始因子4E结合蛋白(eukaryotic initiation factor 4E binding protein, 4EBP)、核糖体蛋白p70S6激酶(p70S6K)等蛋白质合成关键蛋白及自噬过程来平衡蛋白质的合成与降解^[3-4],如通过调控突触可塑相关蛋白NMDAR、SYN等的水平以保证神经元突触应有的可塑性^[5]。这可能是海马内PI3K/Akt信号通路活性改变进一步影响海马依赖性学习记忆功能的又一重要机制。

运动是改善IR的有效手段,但目前有关运动对IR个体海马内PI3K/Akt信号通路活性的影响鲜有报道。已有研究显示,有氧运动可以改善外周IR^[6-7]、提高海马神经元突触可塑性和学习记忆功能、减轻和预防认知障碍^[8],且有氧运动可提高正常啮齿类动物海马内PI3K/Akt信号通路的活性^[9]。同时,人体实验和动物实验的结果均表明有氧运动可以提高认知功能^[10-11],且有氧运动可通过提高啮齿类动物海马内突触可塑相关蛋白的表达进而提高海马依赖的学习记忆功能^[11]。但mTOR及自噬在有氧

运动调节IR小鼠海马内突触可塑相关蛋白表达中的潜在介导机制仍需进一步的研究。

针对上述问题,本实验利用高脂膳食建立IR小鼠模型,并给予有氧运动干预,通过检测各组小鼠海马内PI3K/Akt信号通路、突触可塑相关蛋白的表达情况考察有氧运动对其产生的影响,并检测了mTOR及自噬相关蛋白,探讨其分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物建模及分组

6周龄SPF级C57BL/6J雄性小鼠38只,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司(生产许可证号SCXK(沪)2013-0016),饲养于上海体育学院动物实验中心,12h光照周期,室内温度(22 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,相对湿度40%—70%,自由饮水和摄食。小鼠适应性喂养一周后,随机分为普通对照组(C组,n=12)和IR模型组(n=26),分别进行普通饲料和高脂饲料喂养12周建模。建模结束后,对照组和模型组小鼠均禁食隔夜,于次日尾部静脉采血,通过GTT、ITT结果判定IR模型成功建立(GTT、ITT实验根据IR组与C组曲线下面积具有显著性差异^[12]),并将建模成功的小鼠随机分为胰岛素抵抗安静组(IR组,n=10)、胰岛素抵抗+有氧运动组(AE组,n=10)。

1.2 运动方案与饲料

C组和IR组小鼠不运动,AE组小鼠适应性训练一周后进行为期12周的运动。有氧运动采用坡度为12 $^{\circ}$ 的跑台运动,50min/次,1次/d,5d/周。运动方案参考Fernando等^[13]的研究制定。训练速度安排如下:第一周7m/min,然后以1m/min逐渐增加到第4周的10m/min,接着以0.5m/min逐渐增加到第12周的14m/min,每次训练前后进行10min的热身

运动和整理减速运动。训练期间各组小鼠维持其原有饲料喂养配方。普通饲料及高脂饲料均由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供(表1)。

表1 普通饲料和高脂饲料的构成

	普通饲料供能(%)	高脂饲料供能(%)
蛋白质	24.6	20
脂肪	12.5	60
碳水化合物	62.9	20

1.3 试剂和仪器

兔源抗体 PI3K、Phospho-PI3K、Akt、Phospho-Akt、mTOR、phospho-mTOR、4EBP2、Phospho-4EBP2、Raptor、P70S6K、Phospho-P70S6K、PSD95、LC3购自 Cell Signaling Technology公司,兔源抗体 NMDAR、SYN购自 abcam公司,兔源抗体 Beclin1购自 Novus公司, β -Actin、 β -Tubulin、辣根过氧化酶标记的山羊抗兔 IgG二抗购自 Proteintech公司。彩色预染蛋白质分子量标准购自 Thermo Scientific公司。BCA蛋白浓度测定试剂盒(增强型)购自上海威奥生物科技有限公司。BeyoECL Plus(超敏ECL化学发光试剂盒)及PVDF膜购自 Millipore公司。蛋白质电泳仪、蛋白质转膜装置购自美国 BioRad公司。

1.4 动物取材与样本制备

12周运动干预结束24h后,禁食12h,全部小鼠用10%水合氯醛麻醉(麻醉剂量为4ml/kg体重)后处死,并迅速取脑。冰上剥离海马组织,用EP管保存,并迅速置于-80℃冰箱暂时保存。随后将海马组织剪碎并提取海马全组织蛋白,BCA法进行蛋白浓度测定,根据浓度测定结果,加入一定量的蛋白上样缓冲液(5 $\times$)和PBS,将样本浓度调成4 μ g/ μ l,蛋白上样缓冲液同时被稀释成1 $\times$,稀释好的样本95℃煮沸5min使蛋白变性。将制备好的样本于-80℃保存。

1.5 Western Blot技术检测海马蛋白表达

首先蛋白样本进行SDS-PAGE凝胶电泳,并将胶上分散开的蛋白转印至PVDF膜上。接着PVDF膜用5%脱脂牛奶或BSA室温摇床封闭1—2h,4℃过夜孵育一抗,TBST洗膜3次,每次5min。二抗室温孵育1h,TBST洗3次,每次5min。然后用ECL法发光检测蛋白的表达。用Image J图像分析软件对条带进行灰度值计算,蛋白的磷酸化水平用磷酸化蛋白的灰度值与该蛋白的总蛋白灰度值的比值来表

示,蛋白的表达水平用该蛋白的总蛋白灰度值与内参(β -Actin、 β -Tubulin)灰度值的比值来表示。

1.6 统计学分析

各蛋白指标检测结果用平均数 $\pm$ 标准差表示。所有数据均用SPSS 20.0数据处理软件进行统计分析,C组与IR组,IR组与AE组比较均采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 表示差异具有显著性意义。

2 结果

2.1 有氧运动对IR小鼠海马内PI3K/Akt信号通路的调节作用

与C组相比,IR组小鼠海马内PI3K总蛋白水平和磷酸化水平均无显著性变化,Akt总蛋白水平有下降趋势,磷酸化水平显著性下降($P<0.05$);与IR组相比,AE组PI3K总蛋白水平和磷酸化水平均无显著性变化,Akt总蛋白水平有上升趋势,磷酸化水平显著升高($P<0.05$,图1,表2)。

2.2 有氧运动对IR小鼠海马内突触可塑相关蛋白表达的调节作用

与C组相比,IR组小鼠海马内突触后致密蛋白95(postsynaptic density protein 95, PSD95)、突触素(synaptophysin, SYN)蛋白表达均显著性下降($P<0.05$);与IR组相比,AE组小鼠海马内N-甲基-D-天冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartate receptor, NMDAR)、SYN蛋白表达均显著性增加($P<0.05$,图2,表2)。

2.3 有氧运动对IR小鼠海马内mTOR相关蛋白表达的调节作用

与C组相比,IR组mTOR的总蛋白水平有下降趋势,磷酸化水平显著下降($P<0.05$),Raptor的蛋白水平有下降趋势;与IR组相比,AE组mTOR、Raptor的蛋白水平及mTOR的磷酸化水平均显著性升高($P<0.05$,图3,表2)。

2.4 有氧运动对IR小鼠海马内4EBP2、P70S6K的调节作用

与C组相比,IR组P70S6K的蛋白水平无显著性变化,磷酸化水平有下降趋势,4EBP2的蛋白水平显著升高($P<0.05$);与IR组相比,AE组P70S6K、4EBP2的蛋白水平及磷酸化水平均无显著变化(图4,表2)。

图1 小鼠海马内PI3K、Akt的表达及磷酸化水平

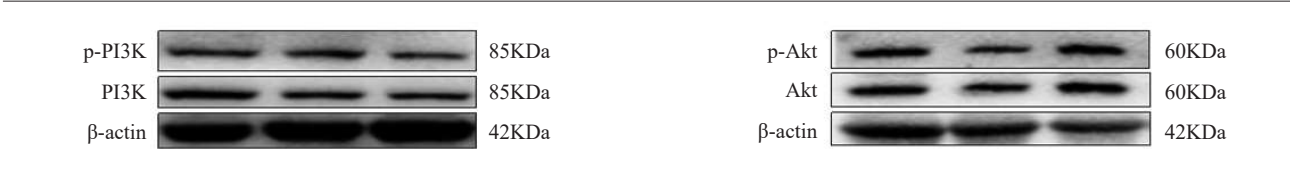
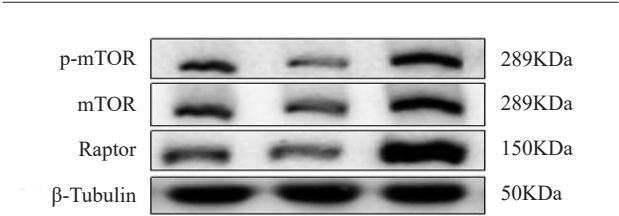


图2 小鼠海马内NMDAR、PSD95、SYN的表达水平



图3 小鼠海马内mTOR、Raptor的表达及mTOR的磷酸化水平



2.5 有氧运动对IR小鼠海马内Beclin1、LC3II/LC3I的调节作用

与C组相比,IR组Beclin1的蛋白水平及LC3II/LC3I均无显著性变化;与IR组相比,AE组Beclin1的蛋白水平有上升趋势,LC3II/LC3I显著性升高($P<0.01$,图5,表2)。

3 讨论

3.1 有氧运动对IR小鼠海马内PI3K/Akt信号通路

表2 各蛋白表达或激活水平 ($\bar{x}\pm s$)

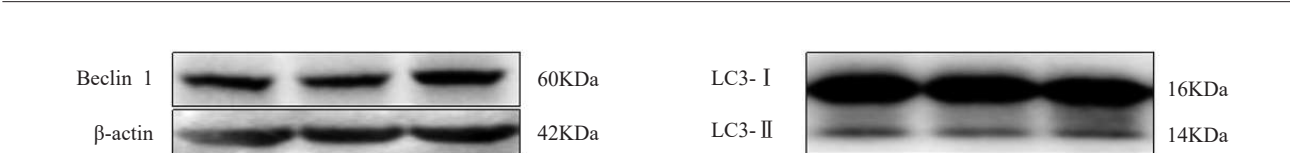
蛋白指标	C组	IR组	AE组
p-PI3K/PI3K	1±0	1.053±0.239	1.014±0.167
PI3K/β-Actin	1±0	0.900±0.224	1.022±0.079
p-Akt/Akt	1±0	0.723±0.212 ^①	0.970±0.247 ^②
Akt/β-Actin	1±0	0.847±0.071	1.048±0.319
NMDAR/β-Actin	1±0	0.870±0.142	1.339±0.386 ^③
PSD95/β-Actin	1±0	0.821±0.159 ^①	0.711±0.147
SYN/β-Actin	1±0	0.767±0.091 ^①	1.019±0.298 ^②
p-mTOR/mTOR	1±0	0.780±0.201 ^①	1.023±0.157 ^②
mTOR/β-Tubulin	1±0	0.808±0.257	1.384±0.379 ^③
Raptor/β-Tubulin	1±0	0.742±0.235	1.338±0.473 ^③
p-P70S6K/ P70S6K	1±0	0.855±0.271	1.109±0.298
P70S6K/β-Actin	1±0	0.966±0.100	1.176±0.324
p-4EBP/4EBP	1±0	0.947±0.286	1.037±0.377
4EBP/β-Actin	1±0	1.292±0.291 ^①	1.193±0.162
Beclin1/β-Actin	1±0	0.949±0.280	1.244±0.461
LC3II/LC3I	1±0	0.918±0.142	1.196±0.226 ^③

注:与C组相比:① $P<0.05$;与IR组相比:② $P<0.05$,③ $P<0.01$
C组:对照组;IR组:胰岛素抵抗安静组;AE组:胰岛素抵抗+有氧运动组

图4 小鼠海马内P70S6K、4EBP的表达及磷酸化水平



图5 小鼠海马内Beclin1的表达水平及LC3 II/LC3 I



的调节作用

大脑是胰岛素依赖性器官,脑内的大部分胰岛素来自外周^[14],胰岛素可以透过血脑屏障进入大脑^[15],通过调节突触传递、突触密度及突触接受刺激后的反应性,在突触可塑性中发挥关键作用^[16]。胰岛素作用的关键起始步骤包括脚手架蛋白的磷酸化和磷酸肌醇-3激酶(phosphatidylinositol-3 kinase, PI3K)的激活,这些早期反应进一步激活蛋白激酶B(protein kinase B,PKB/Akt)^[17]。Gonzalez等^[18]认为Akt的激活是胰岛素调节GLUT4转位的关键环节,其激活水平的下降是胰岛素抵抗的关键特征。

在本研究中,胰岛素抵抗小鼠海马内Akt的磷酸化水平显著性下降,Akt总蛋白有下降趋势,提示胰岛素抵抗小鼠海马内胰岛素信号通路活性被抑制,即可能出现了胰岛素抵抗。这与Pratchayasakul等^[19]研究结果类似,Wistar大鼠经8周高脂膳食(HFD)喂养后出现外周胰岛素抵抗,12周HFD后海马神经元胰岛素信号通路活性下降,表现为离体海马组织受胰岛素刺激的情况下,其胰岛素受体、胰岛素受体底物-1(IRS-1)和Akt的磷酸化水平降低。

有氧运动可提高正常啮齿类动物海马内胰岛素信号通路的活性。Muller和Fang等^[9,20]研究表明,有氧运动可上调正常小鼠或大鼠海马内胰岛素受体、Akt的磷酸化水平,提高SYN、PSD95、 β -neurexin等突触相关蛋白的表达。本研究结果表明,有氧运动也能显著性上调胰岛素抵抗小鼠海马内Akt的磷酸化水平,提高胰岛素信号通路的活性。Kim等^[21]也得出相似的研究结果,12周的跑台运动可提高链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠海马内Akt的活性。

3.2 有氧运动对IR小鼠海马内突触可塑相关蛋白表达的调节作用

NMDAR属于离子型谷氨酸受体,在突触可塑性、兴奋性传递等过程中起关键作用^[22]。PSD95是兴奋性突触中最主要的突触后脚手架蛋白,是突触可塑性的重要分子基础^[23]。SYN存在于轴突末端的突触囊泡膜上,是突触前终末的特异性标志物,可间接反映突触密度和分布^[24]以及突触的神经递质转运能力^[25]。它们的相互作用在诱导长时程增强,促进海马依赖的学习与记忆的形成中发挥关键作用^[26]。

本研究结果显示,高脂膳食诱导的胰岛素抵抗

小鼠海马内NMDAR表达有下降趋势,PSD95和SYN表达显著性下降。与此相一致的研究是:高脂膳食在引起小鼠海马内胰岛素信号通路活性发生改变的同时,引起PSD95的表达与树突棘密度降低^[27]。此外,高脂膳食也会降低大鼠海马内SYN的表达^[11,28]。因此,IR小鼠海马内胰岛素信号通路活性下降的同时,伴随着突触可塑相关蛋白PSD95、SYN的蛋白表达下降。

在本研究中,12周的跑台运动可提高胰岛素抵抗小鼠海马内NMDAR、SYN的表达水平。Chung等^[29]的研究表明,跑台运动可增加小鼠海马内NMDAR蛋白的表达,且在Cassilhas等^[30]探索不同运动对空间记忆的影响的研究中表明,有氧运动也可上调SYN的表达水平。因此,有氧运动可能通过调节海马内NMDAR、SYN的表达水平进而提高胰岛素抵抗小鼠海马依赖的学习和记忆功能。

3.3 有氧运动对IR小鼠海马内mTOR-4EBP2/P70S6K途径及自噬的调节作用

mTOR是PI3K/Akt信号通路的主要下游靶蛋白,它可通过调控蛋白质的合成与分解过程来调节神经元的突触可塑性^[31]。其中,mTOR和mTOR结合相关蛋白(regulatory associated protein of mTOR, Raptor)及mLST8一起形成mTOR复合物1(mTORC1),在神经元的离子通道和受体通道及突触可塑性的调节等过程中发挥着关键性作用^[32]。Raptor是一种桥梁分子,它可以将mTOR与下游靶分子P70S6K、4EBP连接起来。mTOR通过促进P70S6K磷酸化,抑制4EBP去磷酸化来激活蛋白质的合成过程^[3]。此外,mTORC1还可通过抑制翻译后和转录水平的自噬过程来抑制蛋白质的分解过程^[4]。而在自噬过程中,Becn1是启动自噬体形成的标志蛋白,微管相关蛋白1轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3/Atg8)由胞质形式的LC3I在隔离膜上向激活形式LC3II的转化又标志着自噬体的形成,且LC3II的数量与自噬体的数量高度相关,因此Becn1及LC3II和LC3I的比值在一定程度上可共同反应自噬水平^[5]。

在本研究中,胰岛素抵抗小鼠海马内mTORC1活性下降,蛋白质合成过程受阻,自噬水平未发生明显改变。已有研究显示如果将海马切片预处理并用

mTOR抑制剂雷帕霉素连续灌注,则晚期长时程增强持续性严重降低^[33],并且 Arnold 等^[27]研究表明 mTOR 激活失败将导致 PSD95 翻译过程受阻、树突棘密度降低。提示在本研究中的胰岛素抵抗小鼠海马内, mTORC1 活性被抑制是胰岛素信号通路活性下降进一步抑制突触可塑相关蛋白表达的重要机制。Cammalleri 和 Banko 等^[34-35]的研究表明在啮齿类动物海马内, mTOR-P70S6K/4EBP2 途径对于依赖蛋白质合成的突触可塑性及学习和记忆的形成是必不可少的。因此,本研究从侧面反映了胰岛素抵抗小鼠海马内胰岛素信号通路活性的下降抑制了 mTORC1 的活性,并进一步抑制 P70S6K 的激活,促进 4EBP2 的去磷酸化,最终导致蛋白质合成受阻,下调了突触可塑相关蛋白的表达。

本研究结果显示,有氧运动可上调胰岛素抵抗小鼠海马内 mTORC1 的活性,虽未进一步有效调节 P70S6K、4EBP2 的表达水平与活性,但上调了 LC3II/LC3I,提示有氧运动在提高胰岛素抵抗小鼠海马内 mTORC1 活性的同时,其自噬水平也得到了提高。但已有研究表明, mTORC1 可通过与 ULK 复合物或 VPS34 复合物相互作用抑制自噬^[4]。Kang 等^[36]研究发现有氧运动可上调阿尔兹海默症小鼠大脑皮质 PI3K/Akt 的活性,抑制 mTOR 的过度激活,进而提高自噬水平。同时吴文豪^[37]研究结果也表明,当有氧运动提高自噬障碍小鼠海马内 PI3K/Akt 的活性时,可通过下调 mTOR 的过度激活,上调 ULK1 的表达,启动自噬。Zheng 等^[38]通过建立饥饿诱导自噬增加的小鼠模型,发现有氧运动在激活其骨骼肌中 mTOR 的活性时,抑制自噬的过度激活,总之,当 mTOR 被激活时,自噬活性应该被抑制,而本研究结果与之不同。考虑 AMPK、Bcl-2 等也是调节自噬的重要分子机制,且自噬过程较为复杂,而 mTOR 与 LC3II/LC3I 之间的直接关系目前并未得到验证。但自噬对于突触前结构、突触小泡的循环^[39]及长时程抑制过程是必不可少的^[40],具有神经保护作用。提示在本研究中,有氧运动提高胰岛素抵抗小鼠海马内的自噬水平对于突触可塑相关蛋白表达的提高也存在一定的作用,但其机制较为复杂,需要更为具体的研究。

4 结论

本实验表明,胰岛素抵抗小鼠海马内胰岛素信号通路活性受到抑制,并进一步下调 mTOR 的活性,最终损害突触可塑相关蛋白 PSD95、SYN 的表达;有氧运动可通过激活胰岛素抵抗小鼠海马内 PI3K/Akt 信号通路的活性,进而激活 mTORC1,最终提高突触可塑相关蛋白 NMDAR、SYN 的表达。

参考文献

- [1] Biessels GJ, Reagan LP. Hippocampal insulin resistance and cognitive dysfunction[J]. Nature reviews Neuroscience, 2015, 16(11): 660—671.
- [2] 房国梁, 田野, 赵杰修, 等. 有氧运动对肥胖大鼠海马组织 tau 蛋白磷酸化水平及 PI3K/Akt 信号通路的影响[J]. 中国运动医学杂志, 2017, 36(05): 375—382.
- [3] Qi S, Mizuno M, Yonezawa K, et al. Activation of mammalian target of rapamycin signaling in spatial learning[J]. Neuroscience research, 2010, 68(2): 88—93.
- [4] Kim YC, Guan KL. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2015, 125(1): 25—32.
- [5] Shehata M, Inokuchi K. Does autophagy work in synaptic plasticity and memory? [J]. Reviews in the Neurosciences, 2014, 25(4): 543—557.
- [6] Hall KE, McDonald MW, Grise KN, et al. The role of resistance and aerobic exercise training on insulin sensitivity measures in STZ-induced Type 1 diabetic rodents[J]. Metabolism: Clinical and Experimental, 2013, 62(10): 1485—1494.
- [7] Motahari-Tabari N, Ahmad Shirvani M, Shirzad- E- Ahoo-dashty M, et al. The effect of 8 weeks aerobic exercise on insulin resistance in type 2 diabetes: a randomized clinical trial[J]. Global Journal of Health Science, 2014, 7(1): 115—121.
- [8] Liu HL, Zhao G, Cai K, et al. Treadmill exercise prevents decline in spatial learning and memory in APP/PS1 transgenic mice through improvement of hippocampal long-term potentiation[J]. Behavioural Brain Research, 2011, 218(2): 308—314.
- [9] Muller AP, Gnoatto J, Moreira JD, et al. Exercise increases insulin signaling in the hippocampus: physiological effects and pharmacological impact of intracerebroventricular insulin administration in mice[J]. Hippocampus, 2011, 21(10): 1082—1092.
- [10] Lee TM, Wong ML, Lau BW, et al. Aerobic exercise interacts with neurotrophic factors to predict cognitive functioning in adolescents [J]. Psychoneuroendocrinology, 2014, 39: 214—224.
- [11] Cai M, Wang H, Li JJ, et al. The signaling mechanisms of hippocampal endoplasmic reticulum stress affecting neuronal plasticity-related protein levels in high fat diet-induced obese rats and the regulation of aerobic exercise[J]. Brain, Behavior, and Immunity, 2016, 57: 347—359.

- [12] Henley KD, Gooding KA, Economides AN, et al. Inactivation of the dual Bmp/Wnt inhibitor Sostdc1 enhances pancreatic islet function[J]. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 2012, 303(6): E752—761.
- [13] Fernando P, Bonen A, Hoffman-Goetz L. Predicting submaximal oxygen consumption during treadmill running in mice[J]. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 1993, 71(10-11): 854—857.
- [14] Havrankova J, Roth J, Brownstein M. Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat [J]. *Nature*, 1978, 272(5656): 827—829.
- [15] Banks WA, Jaspán JB, Kastin AJ. Effect of diabetes mellitus on the permeability of the blood-brain barrier to insulin [J]. *Peptides*, 1997, 18(10): 1577—1584.
- [16] Chiu SL, Chen CM, Cline HT. Insulin receptor signaling regulates synapse number, dendritic plasticity, and circuit function in vivo[J]. *Neuron*, 2008, 58(5): 708—719.
- [17] Cho H, Mu J, Kim JK, et al. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta)[J]. *Science (New York, NY)*, 2001, 292(5522): 1728—1731.
- [18] Gonzalez E, McGraw TE. Insulin-modulated Akt subcellular localization determines Akt isoform-specific signaling[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(17): 7004—7009.
- [19] Pratchayasakul W, Kerdphoo S, Petsophonakul P, et al. Effects of high-fat diet on insulin receptor function in rat hippocampus and the level of neuronal corticosterone [J]. *Life sciences*, 2011, 88(13-14): 619—627.
- [20] Fang ZH, Lee CH, Seo MK, et al. Effect of treadmill exercise on the BDNF-mediated pathway in the hippocampus of stressed rats[J]. *Neuroscience Research*, 2013, 76(4): 187—194.
- [21] Kim DY, Jung SY, Kim TW, et al. Treadmill exercise decreases incidence of Alzheimer's disease by suppressing glycogen synthase kinase-3beta expression in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Journal of Exercise Rehabilitation*, 2015, 11(2): 87—94.
- [22] Kiss L, Cheng G, Bednar B, et al. In vitro characterization of novel NR2B selective NMDA receptor antagonists [J]. *Neurochemistry International*, 2005, 46(6): 453—464.
- [23] 钱冰, 楼佳庆, 李斌斌, 等. AD 样大鼠模型海马内 PSD-95 表达与学习记忆变化的研究[J]. *神经解剖学杂志*, 2016, 32(2): 217—222.
- [24] 刘苗苗, 金孝珏. 生长相关蛋白和突触素对突触可塑性的影响[J]. *江西医药*, 2013, 48(2): 178—182.
- [25] Garringer HJ, Murrell J, Sammeta N, et al. Increased tau phosphorylation and tau truncation, and decreased synaptophysin levels in mutant BRI2/tau transgenic mice[J]. *PloS one*, 2013, 8(2): e56426.
- [26] Jacobs S, Cui Z, Feng R, et al. Molecular and genetic determinants of the NMDA receptor for superior learning and memory functions[J]. *PloS one*, 2014, 9(10): e111865.
- [27] Arnold SE, Lucki I, Brookshire BR, et al. High fat diet produces brain insulin resistance, synaptodendritic abnormalities and altered behavior in mice[J]. *Neurobiology of Disease*, 2014, 67: 79—87.
- [28] 李静静, 蔡明, 李锋, 等. 高脂膳食对肥胖易感和肥胖抵抗大鼠学习记忆能力的影响及机制 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2017, 33(5): 506—513.
- [29] Chung JW, Seo JH, Baek SB, et al. Treadmill exercise inhibits hippocampal apoptosis through enhancing N-methyl-D-aspartate receptor expression in the MK-801-induced schizophrenic mice[J]. *Journal of Exercise Rehabilitation*, 2014, 10(4): 218—224.
- [30] Cassilhas RC, Lee KS, Fernandes J, et al. Spatial memory is improved by aerobic and resistance exercise through divergent molecular mechanisms[J]. *Neuroscience*, 2012, 202: 309—317.
- [31] Takei N, Nawa H. mTOR signaling and its roles in normal and abnormal brain development[J]. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2014, 7: 28.
- [32] Bockaert J, Marin P. mTOR in Brain Physiology and Pathologies[J]. *Physiological Reviews*, 2015, 95(4): 1157—1187.
- [33] Tang SJ, Reis G, Kang H, et al. A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(1): 467—472.
- [34] Cammalleri M, Lütjens R, Berton F, et al. Time-restricted role for dendritic activation of the mTOR-p70S6K pathway in the induction of late-phase long-term potentiation in the CA1[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(24): 14368—14373.
- [35] Banko JL, Merhav M, Stern E, et al. Behavioral alterations in mice lacking the translation repressor 4E-BP2[J]. *Neurobiology of Learning and Memory*, 2007, 87(2): 248—256.
- [36] Kang EB, Cho JY. Effect of treadmill exercise on PI3K/AKT/mTOR, autophagy, and Tau hyperphosphorylation in the cerebral cortex of NSE/htau23 transgenic mice[J]. *Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry*, 2015, 19(3): 199—209.
- [37] 吴文豪. 跑台运动对 APP/PS1 小鼠海马 PI3K/AKT/mTOR 通路及自噬的影响[D]; 华东师范大学, 2016.
- [38] Zheng DM, Bian Z, Furuya N, et al. A treadmill exercise reactivates the signaling of the mammalian target of rapamycin (mTor) in the skeletal muscles of starved mice[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015, 456(1): 519—526.
- [39] Hernandez D, Torres CA, Setlik W, et al. Regulation of presynaptic neurotransmission by macroautophagy[J]. *Neuron*, 2012, 74(2): 277—284.
- [40] Shehata M, Matsumura H, Okubo-Suzuki R, et al. Neuronal stimulation induces autophagy in hippocampal neurons that is involved in AMPA receptor degradation after chemical long-term depression[J]. *The Journal of neuroscience*, 2012, 32(30): 10413—10422.