

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00697

mTOR 信号通路中上游调控蛋白 Rheb 在脂肪细胞分化中的作用

刘 微^{1△}, 邹俊杰^{1△}, 李晓曦², 赵子建^{2*}, 刘志民^{1*}

1. 第二军医大学长征医院内分泌科, 上海 200003
2. 南京医科大学代谢疾病研究中心, 南京 210029

[摘要] **目的** 观察 mTOR 信号通路中上游调控蛋白 Rheb 对脂肪细胞分化的影响。**方法** 构建 Rheb (Ras homolog enriched in brain) 的重组质粒(pCAG-Insulator-Rheb), 并将其注射到 B6 小鼠的胚胎内, 产生全身高表达 Rheb 的转基因小鼠。提取怀孕雌鼠第 13.5 天的胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast cells, MEFs), PCR 鉴定基因型之后进行成脂诱导分化。通过检测分化第 12 天 MEFs 内三酰甘油的含量、油红 O 染色的结果、实时定量 PCR 方法检测脂肪细胞特异性转录因子 PPAR γ 和 C/EBP α 的表达情况, 来观察 Rheb 在脂肪细胞分化过程中的作用。**结果** 成功构建了全身高表达 Rheb 的转基因小鼠模型, 并且检测到在高表达 Rheb 后, 可以促进 MEFs 内脂滴的生成, 三酰甘油含量增高, 油红 O 染色有明显区别, 并且脂肪细胞特异性转录因子 PPAR γ 和 C/EBP α 的表达量均升高。**结论** Rheb 过表达以后可以促进脂肪细胞的分化。

[关键词] Rheb; mTOR; 脂肪细胞; 细胞分化

[中图分类号] R 339.6 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)07-0697-06

Role of a regulating protein in the upper stream of mTOR signaling pathway Rheb in adipocyte differentiation

LIU Wei^{1△}, ZOU Jun-jie^{1△}, LI Xiao-xi², ZHAO Zi-jian^{2*}, LIU Zhi-min^{1*}

1. Department of Endocrinology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China
2. Center of Metabolic Disease Research, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu, China

[Abstract] **Objective** To observe the effect of Rheb, a regulating protein in the upper stream of mTOR signaling pathway, on adipocyte differentiation. **Methods** (1) The recombinant plasmid pCAG-Insulator-Rheb was constructed and injected into the embryo of B6 mouse to produce transgenic mouse over-expressing Rheb. (2) The mouse embryonic fibroblast cells (MEFs) were collected from Rheb transgenic mice on pregnancy day 13.5, and they were induced to differentiate into adipocytes after identified by PCR. (3) On differentiation day 12, the MEFs were subjected to Oil Red O staining and the contents of triglyceride in the MEFs were determined; moreover, the expression of special transcription factor PPAR γ and C/EBP α was examined by real-time PCR, and all of the above parameters were used to assess the role of Rheb in the differentiation of adipocytes. **Results** We successfully constructed the transgenic mouse model over-expressing Rheb. We found that mouse over-expressing Rheb promoted adipogenesis in MEFs and increased the content of triglyceride in MEFs; moreover, the overexpression also greatly changed the results of Oil Red O staining and greatly promoted the expression of adipocyte specific transcript factor PPAR γ and C/EBP α . **Conclusion** Over-expression of Rheb can promote the differentiation of MEFs into adipocytes.

[Key words] Rheb; mTOR; adipocytes; cell differentiation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(7):697-702]

Rheb 是一种小 GTP 酶, 属于鸟苷酸结合蛋白 Ras 超家族中的一员^[1], 最初发现于经突触激活诱导后的大鼠海马区^[2], 广泛存在于各种真核生物中,

是一个高度保守的蛋白^[3-6], 参与调节机体的众多生物学功能, 如生长存活、能量代谢、氧化应激等^[7-10]。Rheb 有两种存在方式, 即无活性的 GDP-Rheb 与有

[收稿日期] 2012-03-24 **[接受日期]** 2012-05-16

[基金项目] 国家自然科学基金(81170780). Supported by National Natural Science Foundation of China(81170780).

[作者简介] 刘 微, 硕士生. E-mail: wys7305e@163.com; 邹俊杰, 副教授. E-mail: zjj1688@163.com

Δ 共同第一作者(Co-first authors).

* 通信作者(Corresponding authors). Tel: 025-86862086, E-mail: azzhao30@gmail.com; Tel: 021-81885371, E-mail: zmliu-cz@hotmail.com

活性的 GTP-Rheb。当胰岛素、生长因子存在,机体营养供应充足、能量丰富的时候,Rheb 主要与 GTP 结合成 GTP-Rheb,发挥其生物学作用,这主要是通过抑制 TSC1/2 的作用来实现的^[11-12]。TSC1/2 是一种肿瘤抑制蛋白,同时是一种 GTP 酶活化蛋白,能激活 Rheb 本身所具有的 GTP 酶活性,从而将 GTP-Rheb 水解为 GDP-Rheb,使 Rheb 失活。大量数据表明,提高 Rheb 的表达水平可以过度激活 mTORC1 的活性^[13-14],同时 Chang 等^[15]和 Chakrabarti 等^[16]从不同方面证实 mTORC1 参与了脂代谢过程;提高 mTORC1 活性促进成脂,而抑制 mTORC1 活性则可以减少脂肪的形成,并能够抵抗高脂饮食诱导的肥胖。在 mTORC1 信号通路核心轴上,Rheb 处于 mTORC1 的上游,对 mTORC1 的活性起着重要的调控作用,因此 mTORC1 参与脂代谢的过程很可能也会受到 Rheb 的调控。在本研究中,我们构建了 Rheb 野生型全身高表达转基因小鼠,观察在 Rheb 高表达引起 mTORC1 活性增高后是否对脂肪分化产生促进作用,从而进一步证明 Rheb 是否参与调节脂代谢过程。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、质粒和菌株 HEK 293T 细胞、绝缘子和真核表达载体 pCAG-MCS 来自南京医科大学细胞生物学实验室;pDM19-T Vector 购自中国大连 TaKaRa 公司;DH5 α 购自中国上海 Bio Teke 公司。

1.1.2 主要试剂 DMEM 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司),胰蛋白酶 Trypsin(美国 Amresco 公司),二甲亚砜(DMSO,美国 Amresco 公司),3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx,美国 Sigma 公司),油红 O(Oil Red O,美国 Sigma 公司),质粒转染试剂盒(瑞士 Roche 公司),反转录试剂盒(中国大连 TaKaRa 公司),所有限制性内切酶与连接酶(美国 New England Biolabs 公司),质粒小提/中提试剂盒(中国天根公司/德国 Qiagen 公司),感受态 DH5 α (中国上海 Bio Teke 公司),胰岛素(丹麦诺和诺德公司),TG 试剂盒(中国北京北化康泰公司),Tubulin Mouse mAb 抗体(美国 Sigma 公司),S6 Rabbit mAb 和 pS6 Rabbit mAb 抗体(美国 CST 公司),Anti-rabbit IgG、HRP-linked Antibody、Anti-mouse IgG、HRP-linked Antibody(美国 Santa Cruz 公司),

Rheb Mouse mAb 抗体由本实验自制。

1.2 重组质粒 pCAG-Insulator-Rheb 的构建

1.2.1 反转录和 PCR 方法 先提取野生型(wild type, WT)对照小鼠 B6 小鼠怀孕第 13.5 天的胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast cells, MEFs),然后按照 Invitrogen 公司提供的 RNA 提取方法,提取 MEFs 内总 RNA,再将提取的总 RNA 按照 TaKaRa 公司提供的试剂盒反转录为 cDNA。再以此 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增反应。反应体系为 50 μ l;反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,53 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s,30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 扩增引物:上游引物,5'-AGT GAA TTC GCC GCC ACC ATG CCT CAG TCC AAG TCC CG-3';下游引物,5'-TAT GCG GCC GCT CGA GT CAC ATC ACC GAG CAC GAA GAC-3'。上下游引物中分别含有 *EcoR* I (GAA TTC)和 *Not* I (GCG GCC GC)酶切位点。

1.2.2 重组载体的构建和鉴定 PCR 方法得到带有 *EcoR* I 和 *Not* I 限制性酶切位点的长为 586 bp 的小鼠野生型 Rheb 基因片段,将此片段与 TaKaRa 公司提供的 T 载体 pDM19-T Vector 用 T4 Ligase 进行连接,连接条件:16 $^{\circ}$ C,12 h。将连接产物按照 Bio Teke 公司提供的说明书转化进入感受态 DH5 α 大肠杆菌,然后将转化产物进行琼脂平板涂板接种,37 $^{\circ}$ C 培养 12~16 h,挑取单克隆菌落置于 LB 液体培养基进行摇菌,12~15 h 后用 TaKaRa 公司提供的质粒小提试剂盒进行质粒提取。将提取的质粒用 1 μ l 行 1%琼脂糖凝胶电泳,选择片段大小正确的质粒,然后根据 New England Biolabs 公司说明书进行 *EcoR* I 和 *Not* I 限制性内切酶双酶切,从而将小鼠 Rheb 目的基因从 T Vector 上酶切下来,将双酶切产物行 1%琼脂糖凝胶电泳,再用 TaKaRa 公司提供的琼脂糖凝胶回收试剂盒进行酶切后目的片段的回收。然后将回收得到的目的片段用同样的方法连接进入真核表达载体 pCAG-MCS,构建重组质粒 pCAG-Rheb,使 Rheb 目的基因获得 pCAG 启动子序列。最后用 *Sal* I 和 *Bam*H I 将带有 pCAG 启动子序列的 Rheb 目的基因从 pCAG-Rheb 重组质粒上双酶切下来,后连入带有绝缘子的表达载体,最终构成我们需要的重组质粒 pCAG-Insulator-Rheb。再分别用 *EcoR* I 与 *Not* I、*Sal* I 与 *Bam*H I 和 I-

Ceu I 三组限制性内切酶对构建好的重组质粒 pCAG-Insulator-Rheb 进行初步的酶切鉴定, 初步鉴定成功的质粒送 Invitrogen 公司测序。将测序正确、带有绝缘子序列和 pCAG 启动子序列的 Rheb 目的基因送交南京大学模式动物所进行原核胚胎注射, 构建 Rheb 野生型全身高表达转基因小鼠。

1.2.3 重组质粒瞬时转染 HEK 293T 细胞 细胞培养于含 10% FBS 的 DMEM 培养基中, 取对数生长期的 HEK 293T 细胞, 胰酶/EDTA 消化后接种入 6 孔板中, 于 37°C 含 5% CO₂ 的恒温孵育箱中培养 24 h (细胞生长密度在 80%~90%)。将用中得到的测序正确的重组质粒 pCAG-Insulator-Rheb 进行瞬时转染。对照组分为 2 组: 空白对照组 (即未转染质粒) 和阴性对照组 (即转染等量的对照质粒)。对照质粒是带有绿色荧光蛋白 (EGFP) 的空白质粒, 也来自于南医大细胞生物学实验室。

1.2.4 蛋白质印迹法检测重组质粒表达量 重组质粒 pCAG-Insulator-Rheb 转染 HEK 293T 细胞 48 h 后提取细胞总蛋白, 进行 12% SDS-PAGE 分离, 再将胶上蛋白转移至 PVDF 膜上, 含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 2 h。1:1 000 稀释的 Rheb 抗体作为一抗, 1:5 000 稀释的 Goat Anti-Rabbit IgG 作为二抗, ECL 显色。

1.2.5 氨基酸饥饿实验检测重组质粒功能 质粒转染 48 h 后对其进行氨基酸饥饿 (含 4.5 g/L 葡萄糖的 PBS) 2 h, 然后提取总蛋白检测 pS6 的表达情况, 从而检测重组质粒是否具有相应的功能。

1.3 Rheb 转基因小鼠的 MEFs 诱导分化 用 PCR 方法鉴定 Rheb 转基因小鼠基因型。共 5 只阳性首建鼠。蛋白质印迹法检测转基因小鼠肝脏组织 Rheb 过表达情况。用成脂诱导分化刺激剂 (I: 0.5 mmol/L IBMX, 1 μmol/L dexamethasone, 1 μg/ml insulin; II: 1 μg/ml insulin) 进行 MEFs 细胞的诱导分化实验, 加入刺激剂 I 的当天记为第 1 天, 第 3 天换上刺激剂 II, 此后每隔 1 d 更换刺激剂 II, 直至分化第 12 天。进行显微镜下拍照及油红 O 染色。用三酰甘油检测试剂盒检测 MEFs 细胞内三酰甘油含量。实时定量 PCR 检测脂肪细胞特异性转录因子 PPAR γ 和 C/EBP α 的表达情况。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件系统进行统计学分析, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验。检验水平 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 质粒鉴定 将构建的重组质粒 pCAG-Insulator-Rheb 行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 质粒超螺旋大小位置正确, 结果见图 1A。再用 *EcoR* I 与 *Not* I、*Sal* I 与 *Bam* H I 和 I-Ceu I 三组限制性内切酶进行酶切鉴定, 根据质粒图谱, 所得片段大小位置均正确, 结果见图 1B。后 Invitrogen 公司测序正确, 表明质粒构建成功。

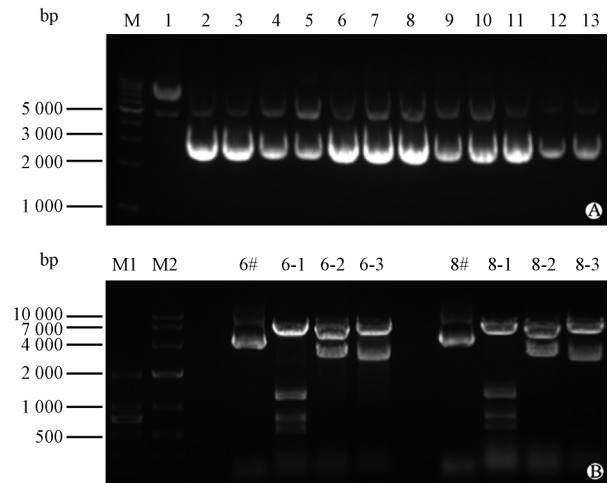


图 1 重组质粒 pCAG-Insulator-Rheb 的构建

Fig 1 Construction of recombinant plasmid pCAG-Insulator-Rheb

A: Agarose gel electrophoresis analysis of recombinant plasmid pCAG-Insulator-Rheb. M: 1 000 bp DNA ladder marker; 1-13: Recombinant plasmids 1 # -13 #; B: Enzyme digestion analysis of recombinant plasmid pCAG-Insulator-Rheb. M1: 2 000 DNA marker; M2: 10 000 DNA marker; 6 #: pCAG-Insulator-Rheb plasmid 6 #; 6-1, 6-2, 6-3: Products after restriction enzyme digestion by *EcoR* I and *Not* I, *Sal* I and *Bam* H I, I-Ceu I. 8 #: pCAG-Insulator-Rheb plasmid 8 #; 8-1, 8-2, 8-3: Products after restriction enzyme digestion by *EcoR* I and *Not* I, *Sal* I and *Bam* H I, I-Ceu I

2.2 质粒过表达及功能鉴定 将重组质粒 pCAG-Insulator-Rheb 瞬时转染进入 HEK 293T 细胞, 48 h 后提取 HEK 293T 细胞总蛋白, 行蛋白印迹分析 Rheb 过表达情况, 结果在相对分子质量 20 000 处出现特异性蛋白条带, 实验组该特异性条带明显比 2 个对照组要亮许多, 说明 Rheb 确实有过表达, 结果见图 2A。同时用氨基酸饥饿实验检测过表达 Rheb 蛋白是否具有相应的生物学活性, 相对于空白对照组和阴性对照组, 转染重组质粒 pCAG-Insulator-Rheb 的实验组可以抵抗氨基酸饥饿, 说明过表达 Rheb 蛋白具有相应的生物学功能, 结果见图 2B。

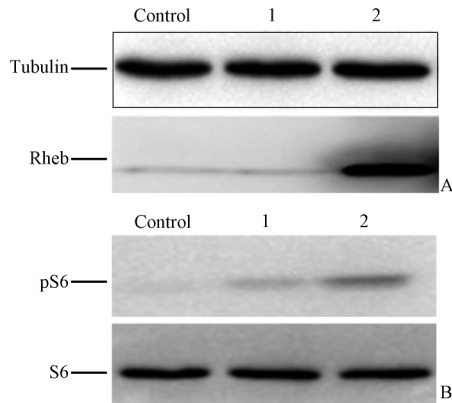


图2 转染48 h后 HEK 293T 细胞内 Rheb 基因表达及功能分析结果

Fig 2 Rheb expression and function analysis by Western blotting analysis in HEK 293T cells at 48 h after transfection

A: Rheb expression analysis; B: pS6 expression analysis in HEK 293T in amino acid starvation 2 h. 1: Transfected with empty plasmid with EGFP; 2: Transfected recombinant plasmid pCAG-Insulator-Rheb

2.3 转基因小鼠基因型鉴定 用 PCR 方法鉴定 Rheb 转基因阳性小鼠 5 只首建鼠的基因型。根据阳参质粒条带位置,5 只首建鼠在同一位置均出现条带,而阴性 B6 小鼠和空白对照组则无,说明 Rheb 转基因小鼠构建成功。结果见图 3。

2.4 转基因小鼠肝脏组织 Rheb 过表达量检测 相对于同窝出生的野生型 B6 小鼠,转基因阳性小鼠 Rheb 蛋白表达量升高,但 34 # 小鼠 Rheb 蛋白过表达不明显。蛋白质印迹分析结果见图 4。

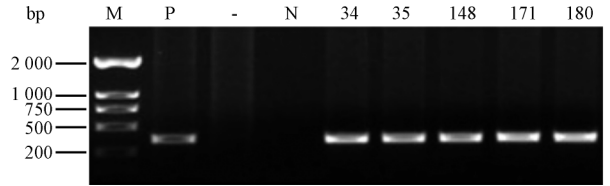


图3 PCR 鉴定 Rheb 转基因小鼠基因型

Fig 3 Genotyping analysis of Rheb transgenic mouse by PCR (Rheb size: 364 bp)

M: 2 000 bp DNA marker; P: Recombinant plasmid pCAG-Insulator-Rheb; -: B6 mouse; N: Water; 34, 35, 148, 171, 180; The 5 founders of positive Rheb transgenic mice

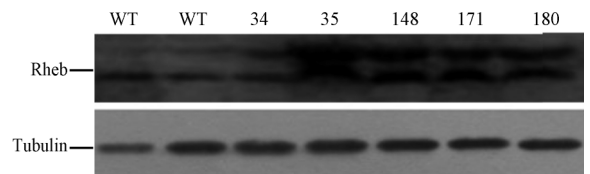


图4 小鼠肝脏组织 Rheb 过表达量分析

Fig 4 Rheb expression analysis of mouse hepatic tissue by Western blotting analysis

WT: Wild type B6 mouse; 34, 35, 148, 171, 180; The 5 founders of positive Rheb transgenic mice

2.5 脂肪形成程度的定性分析 分化第 12 天,倒置显微镜 20× 镜下观察 MEFs 细胞内脂肪形成的程度,相对于野生型 B6 小鼠,Rheb 过表达可以明显促进脂肪分化,结果见图 5A、5B。同时,油红 O 染色进一步证实 Rheb 过表达以后可以促进脂肪细胞分化,结果见图 5C、5D。

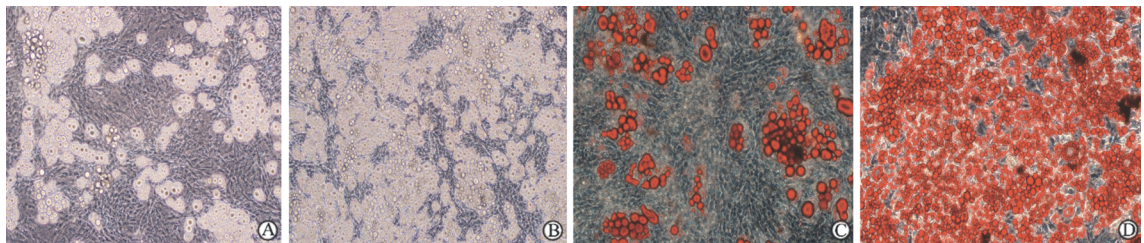


图5 MEFs 诱导分化后第 12 天脂滴形成程度的定性分析

Fig 5 MEFs' differentiation degree on the day 12 after differentiation

A, B: The degree of MEFs differentiation under microscope; C, D: Oil Red O staining; A, C: Wild type B6 mouse; B, D: Positive Rheb transgenic mouse. Original magnification: ×20

2.6 MEFs 细胞光密度值与三酰甘油含量检测 分化第 12 天,野生型 MEFs 细胞与 Rheb 转基因阳性 MEFs 细胞在 500 nm 处光密度值分别为 0.025 ± 0.005 、 0.051 ± 0.007 ; MEFs 细胞内三酰甘油含量分别为 (0.159 ± 0.032) 、 (0.322 ± 0.046)

mmol/L,两组间差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.7 脂肪细胞特异性转录因子 PPAR γ 和 C/EBP α 的表达情况 分化第 12 天,野生型 MEFs 细胞与 Rheb 转基因阳性 MEFs 细胞 PPAR γ 的表达量(采用 $\Delta\Delta C_T$ 值表示)分别为 420.27 ± 18.24 与

5 499.70±246.52, C/EBP α 的表达量分别为 2.51±0.13与 9.51±0.37,两组间差异均具有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

白色脂肪组织在体内囤积过多,包括白色脂肪细胞体积的增大和数量的增多,是肥胖的主要发病原因。2002年中国流行病学调查研究指出,中国成年人肥胖患病率为 7.1%,比 1992年增加了 97.2%^[17]。统计报告还指出,在我国现阶段肥胖人数已经达到 9 000 万,如果得不到有效的控制,2015年估计我国的肥胖人口将增至 2 亿^[18]。肥胖及其相关并发症如 2 型糖尿病^[19]、心血管疾病^[20]、非酒精性脂肪肝、癌症等由于具有较高的致残致死率给人们带来了极大的负担,如何有效地治疗肥胖是近年来研究的热点。要想从根本上防治肥胖,我们就必须了解肥胖发生发展的分子机制。从这一点出发,明确白色脂肪细胞分化成熟的调控机制就显得尤为重要。本次实验研究证实,提高体内 Rheb 蛋白的表达可以有效地促进脂肪细胞的分化形成,为进一步阐明脂肪细胞分化调控机制提出了一个新的观点。

根据 mTOR 复合物的组成成分,mTOR 复合物包含两种形式,mTORC1 和 mTORC2。大量有关于 mTOR 的体内外实验研究主要是针对 mTORC1 而言。mTORC1 主要参与调节细胞生长、存活、应激、能量代谢等^[7-9],抑制 mTORC1 的活性可以明显损害胚胎发育过程^[10]。mTORC1 对其特异性抑制剂雷帕霉素极其敏感。而 mTORC2 主要参与调节细胞骨架蛋白 actin 的生成,急性短期雷帕霉素对 mTORC2 无效,但长期雷帕霉素处理可以抑制 mTORC2 的合成。从 Akt-TSC1/2-Rheb-mTORC1 信号转导通路^[21-24]中我们可以知道,Rheb 位于 mTORC1 上游,对 mTORC1 的功能起着重要的调控作用。Rheb 是小 G 蛋白 Ras 的同源物,在体内存在无活性的 GDP-Rheb 和有活性的 GTP-Rheb 两种形式。当体内的 TSC1/2 复合体被活化以后,可以激活 Rheb 本身所具有的 GTP 酶的活性,从而将 GTP-Rheb 水解为 GDP-Rheb。然而只有 GTP-Rheb 才能对 mTORC1 的活性起到正向调节作用,因此 TSC1/2 复合体对 mTORC1 的活性起重要的

负性调节作用。当胰岛素等刺激因素存在时,可以通过胰岛素受体底物通路激活 Akt,活化的 Akt 可以磷酸化下游的 TSC1/2 复合体,使其磷酸化失活,从而解除 TSC1/2 对 Rheb 的抑制作用,使得 Rheb 激活 mTORC1 的作用得以显现。最近,有研究报道称用雷帕霉素长期喂养的小鼠比正常对照组小鼠明显瘦小很多,即能抵抗高脂饮食诱导的肥胖^[15]。也就是长期抑制 mTORC1 的活性可以抵抗高脂饮食诱导的肥胖。而 Chakrabarti 等^[16]从反面证实了该理论,指出提高 mTORC1 活性可以抑制脂肪分解、促进脂肪形成和储存。因此 mTORC1 过度激活后促进脂肪形成也很可能受到 Rheb 的调节。为了证明该假设,我们构建了 Rheb 野生型全身高表达小鼠动物模型,使用前文描述的成脂诱导分化剂进行成脂诱导分化。在分化的第 12 天显微镜下观察 MEFs 分化程度,发现阴性对照组脂肪细胞呈片状分布,中间较多区域无脂滴出现,而 Rheb 过表达组脂滴几乎充满整个视野,说明 Rheb 过表达确实可以促进脂肪细胞分化。油红 O 染色也进一步反映了该现象。通过对分化第 12 天的 MEFs 内三酰甘油含量的测定与脂肪细胞特异性转录因子 PPAR γ 和 C/EBP α 表达量进行定量检测,发现 Rheb 过表达以后,MEFs 内三酰甘油含量升高,同样转录因子 PPAR γ 和 C/EBP α 的表达量也增高,这些结果均证实 Rheb 过表达以后确实可以促进脂肪细胞分化。因此本次实验研究证实,Rheb 在脂肪细胞分化过程中起着重要的正向调节作用,即 Rheb 过表达可以促进脂肪细胞的分化。

然而,Rheb 过表达促进脂肪细胞分化涉及到的信号转导通路,本次实验并没有给予研究回答。也就是 Rheb 过表达促进脂肪细胞分化是否通过上调 mTORC1 的活性或者通过其他信号转导通路来实现的,我们目前还不清楚。下一步实验研究可以对 mTORC1 直接调控的下游靶蛋白 S6K、S6 进行磷酸化水平的检测来证实,或者利用 mTORC1 的特异性抑制剂雷帕霉素通过抑制 mTORC1 的活性来进行验证。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Reuther G W, Der C J. The Ras branch of small GTPase: Ras family don't fall far from the tree[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2000, 12: 157-165.
- [2] Yamagata K, Sanders L K, Kaufmann W E, Yee W, Barnes C A, Nathans D, et al. Rheb, a growth factor- and synaptic activity- regulated gene, encodes a novel Ras-related protein[J]. *Biol Chem*, 1994, 269: 16333-16339.
- [3] Raaijmakers J H, Bos J L. Specificity in Ras and Rap signaling. [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284: 10995-10999.
- [4] Borasio G D, John J, Wittinghofer A, Barde Y A, Sendtner M, Heumann R. Ras p21 protein promotes survival and fiber outgrowth of cultured embryonic neurons[J]. *Neuron*, 1989, 2: 1087-1096.
- [5] Bonni A, Brunet A, West A E, Datta S R, Takasu M A, Greenberg M E. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms[J]. *Science*, 1999, 286: 1358-1362.
- [6] Chakrabarty K, Serchov T, Mann S A, Dietzel I D, Heumann R. Enhancement of dopaminergic properties and protection mediated by neuronal activation of Ras in mouse ventral mesencephalic neurones [J]. *Eur J Neurosci*, 2007, 25: 1971-1981
- [7] Manning B D, Cantley L C. Rheb fills a GAP between TSC and TOR. *Trends Biochem [J]*. *Cell*, 2003, 28: 573-576.
- [8] Aspuria P J, Tamanoi F. The Rheb family of GTP-binding protein[J]. *Cell Signal*, 2004, 16: 1105-1112.
- [9] Park K K, Liu K, Hu Y, Smith P D, Wang C, Cai B, et al. Promoting axon regeneration in the adult CNS by modulation of the PTEN/mTOR pathway[J]. *Science*, 2008, 322: 963-966.
- [10] Goorden S M, Hoogeveen-Westerveld M, Cheng C, van Woerden G M, Mozaffari M, Post L, et al. Rheb is essential for murine development[J]. *Mol Cell Biol*, 2011, 31: 1672-1678.
- [11] Li Y, Corradetti M N, Inoki K, Guan K L. TSC2: filling the GAP in the mTOR signaling pathway[J]. *Trends Biochem Sci*, 2004, 29: 32-38.
- [12] Inoki K, Li Y, Xu T, Guan K L. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling[J]. *Genes Dev*, 2003, 17: 1829-1834.
- [13] Garami A, Zwartkruis F J, Nobukuni T, Joaquin M, Rocco M, Stocker H, et al. Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2[J]. *Mol Cell*, 2003, 11: 1457-1466.
- [14] Tee A R, Manning B D, Roux P P, Cantley L C, Blenis J. Tuberosclerosis complex gene products, Tuberlin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb[J]. *Curr Biol*, 2003, 13: 1259-1268.
- [15] Chang G R, Chiu Y S, Wu Y Y, Chen W Y, Liao J W, Chao T H, et al. Rapamycin protects against high fat diet-induced obesity in C57BL/6J mice[J]. *J Pharmacol Sci*, 2009, 109: 496-503.
- [16] Chakrabarti P, English T, Shi J, Samas C M, Kandror K V. Mammalian target of rapamycin complex 1 suppresses lipolysis, stimulates lipogenesis, and promotes fat storage [J]. *Diabetes*, 2010, 59: 775-781.
- [17] Chen C M. Overview of obesity in Mainland China[J]. *Obes Rev*, 2008, 9(Suppl 1): 14-21.
- [18] Cheng T O. Obesity epidemic in modern China[J]. *Int J Cardiol*, 2007, 118: 397.
- [19] Weyer C, Foley J E, Bogardus C, Tataranni P A, Pratley R E. Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts type II diabetes independent of insulin resistance[J]. *Diabetologia*, 2000, 43: 1498-1506.
- [20] Semenkovich C F. Insulin resistance and atherosclerosis[J]. *J Clin Invest*, 2006, 116: 1813-1822.
- [21] Bai X, Jiang Y. Key factors in mTOR Regulation[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67: 239-253.
- [22] Huang J, Manning B D. A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes[J]. *Biochem Soc Trans*, 2000, 37(Pt 1): 217-222.
- [23] Harris T E, Lawrence J C Jr. TOR signaling[J]. *Sci STKE*, 2003(212): re15.
- [24] Rosner M, Hanneder M, Siegel N, Valli A, Fuchs C, Hengstschlager M. The mTOR pathway and its role in human genetic diseases[J]. *Mutat Res*, 2008, 659: 284-292.

[本文编辑] 尹 茶