论著

文章编号:1000-5404(2007)15-1514-03

替米沙坦对糖尿病大鼠认知功能的保护作用

高 原,肖 谦,赵柯湘,吴绮楠,李龙英,高爱滨,张海娜 (重庆医科大学附属第一医院老年科内分泌组,重庆 400016)

提 要:目的 观察血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂替米沙坦对糖尿病大鼠认知功能的保护作用。**方法** 将40只大鼠随机分为正常对照组、糖尿病组、糖尿病+替米沙坦组。建立链脲佐菌素(streptozotocin,STZ)糖尿病大鼠模型,替米沙坦干预12周,Morris水迷宫测试其学习记忆能力,透射电镜观察海马CA1区突触超微结构。**结果** 替米沙坦组与糖尿病组比较,Morris水迷宫测试中潜伏期明显缩短($P<0.05$),中心区停留时间百分比和通过原平台位置次数增加($P<0.05$),电镜下海马突触结构明显改善。**结论** 替米沙坦对糖尿病大鼠认知功能有保护作用。

关键词:替米沙坦;糖尿病;认识;突触

中图法分类号:R338.64;R587.205;R977.1 **文献标识码**:A

The study of the protection of telmisartan on the cognitive function in diabetic rats

GAO Yuan, XIAO Qian, ZHAO Ke-Xiang, WU Qi-nan, LI Long-ying, GAO Ai-bin ZHANG Hai-na (Endocrinology group, Department of Geriatrics, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

Abstract: **Objective** To observe the protection of telmisartan on the cognitive function in diabetic rats. **Methods** 40 rats were randomly divided into the normal control group, diabetic model group and the telmisartan treatment group. Streptozotocin-diabetic rat model was established. The diabetic rats were treated with telmisartan for 12 weeks. Then, the learning and memory abilities of rats were tested with the Morris water maze. Transmission electron microscope was used to observe synapse ultrastructure in hippocampal CA1 area. **Results** Compared with diabetic model group, the telmisartan treatment group showed a significant decrease in the mean time of escape latencies ($P<0.05$) and an increase in percentage of stay time in the central area and the frequency of passing the original platform position ($P<0.05$). Under electron microscope, hippocampal synapse structure improved. **Conclusion** It is concluded that telmisartan treatment may protect cognitive function in diabetic rat.

Key words: telmisartan; diabetes; cognition; synapse

糖尿病脑病(diabetic encephalopathy)临床上以认知障碍为特点,表现为学习记忆能力减退、空间时间定向困难,重者可发展为痴呆[1]。肾素-血管紧张素系统(rennin angiotensin system,RAS)与突触结构重塑和记忆密切相关[2]。已有研究发现血管紧张素转换酶抑制剂可改善糖尿病大鼠认知功能[3],而有关血管紧张素受体阻断剂(angiotensin receptor blocker,ARB)对糖尿病大鼠学习记忆功能的保护作用国内外尚少见文献报道。本研究从学习记忆的中枢海马入手,利用糖尿病大鼠模型,观察血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ,Ang Ⅱ)受体拮抗剂替米沙坦(telmisartan)对糖尿病大鼠海马突触结构和行为学的影响,探讨替米沙坦对认知障碍的预防和治疗作用。

1 材料与方法

1.1 材料

链脲佐菌素STZ(streptozotocin,STZ,美国Alexis公司);LifeScan血糖仪(美国强生);Morris水迷宫及水迷宫记录分析系统(中国医学科学院药物研究所研制);替米沙坦(德国Boehringer Ingelheim公司,商品名:美卡素)。

1.2 动物

Wistar雄性大鼠40只,10周龄,体质量180~200 g,由重庆医科大学实验动物中心提供。抽签法分为3组:①正常对照组(N组,$n=10$);②糖尿病组(D组,$n=15$);③糖尿病+替米沙坦组(T组,$n=15$)。采用STZ制备的糖尿病鼠模型方法[4]:大鼠禁食12 h,糖尿病组和糖尿病+替米沙坦组按65 mg/kg剂

基金项目:重庆市卫生局项目(0702077)
Supported by the Bureau of Public Health of Chongqing (0702077)

作者简介:高 原(1975-),女,四川省成都市人,硕士研究生,医师,主要从事糖尿病慢性并发症方面的研究。电话:13500339770,E-mail:yuamfox@yahoo.com.cn

通讯作者:肖 谦,电话:(023)89011252

收稿日期:2006-12-08;**修回日期**:2007-01-22

量腹腔一次注射 1% STZ(溶于 pH 4.2,0.1 mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液),正常对照组注射等容积缓冲液。血糖仪监测尾静脉血血糖,血糖稳定 3 d 后,血糖 > 16.67 mmol/L 糖尿病模型制作成功。成模同时替米沙坦组给予替米沙坦灌胃 13.3 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$,干预 12 周;正常对照组和糖尿病组同期给予等量生理盐水灌胃。实验终点糖尿病组死亡 5 只,替米沙坦组死亡 3 只。

1.3　开场实验(open-field test)

成模第 12 周进行开场实验[5]。立方形敞箱,高 40 cm,长、宽均为 80 cm,周壁、底面为黑色,底面用白线划分为面积相等的 25 块。每只动物测定 1 次,每次测定 5 min。将大鼠置于敞箱底面的中心方格内,以动物穿越底面的格数记录为水平运动次数了解大鼠的活动度,以后肢直立次数记录为垂直运动次数了解大鼠对新鲜环境的好奇程度,并计数修饰次数及大便粒数。每次实验均在上午 7:00 ~ 12:00 进行,实验室内暗光、安静,两次实验之间将箱底打扫干净。

1.4　Morris 水迷宫(Morris water maze)测试

开场实验结束后进行 Morris 水迷宫测试[6]。Morris 水迷宫操作系统,包括直径 150 cm 的圆形水池,直径 10 cm、高 15 cm 的平台,平台表面低于水面 2 cm,水迷宫记录分析系统。训练 4 d,第 5 天进行隐藏平台获得实验,分析处理潜伏期,考察学习能力。第 6 天撤去平台,进行空间搜索实验——去除平台并观察 2 min 内大鼠在中心区停留时间百分比和通过原平台位置次数,测试记忆能力。

1.5　超微结构观察

行为学实验结束后,每组抽签法选取 5 只大鼠,2% 戊二醛灌注固定,开颅取脑,在解剖镜下切取海马 CA1 区组织块,1% 锇酸固定 1 h,梯度丙酮脱水,EPon812 包埋,超薄切片机切片,醋酸铀、柠檬酸铅双重染色。观察突触超微结构的变化。

1.6　统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,分析采用 SAS 8.0 统计分析软件,ANOVA分析,并作组间两两比较。

2　结果

2.1　Morris 水迷宫测试结果

2.1.1　隐藏平台获得实验　　与正常对照组比较,糖尿病组潜伏期增加,差异有显著性($P < 0.05$)。与糖尿病组比较,替米沙坦组潜伏期明显缩短($P < 0.05$);与正常对照组比较,替米沙坦组潜伏期稍延长,但无统计学差异($P > 0.05$),见表 1。

2.1.2　空间搜索实验　　与正常对照组比较,糖尿病组中心区停留时间百分比和通过原平台位置次数明显下降($P < 0.05$)。与糖尿病组比较,替米沙坦组上述指标明显增加($P < 0.05$);替米沙坦组与正常对照组比较,上述指标差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

表 1　大鼠空间搜索实验/隐蔽平台搜索的实验结果

组别	n	中心区域(%)	穿越目标区次数	逃避潜伏期(t/s)
N 组	10	23.33 ± 2.91	3.20 ± 1.93	15.26 ± 7.28
D 组	10	15.02 ± 5.36[a]	2.22 ± 1.20[a]	22.07 ± 13.64[a]
T 组	12	25.49 ± 2.46[b]	3.30 ± 1.16[b]	15.62 ± 11.22[b]

a: $P < 0.05$,与正常对照组(N 组)比较; b: $P < 0.05$, 与糖尿病组(D 组)比较

2.2　开场实验结果

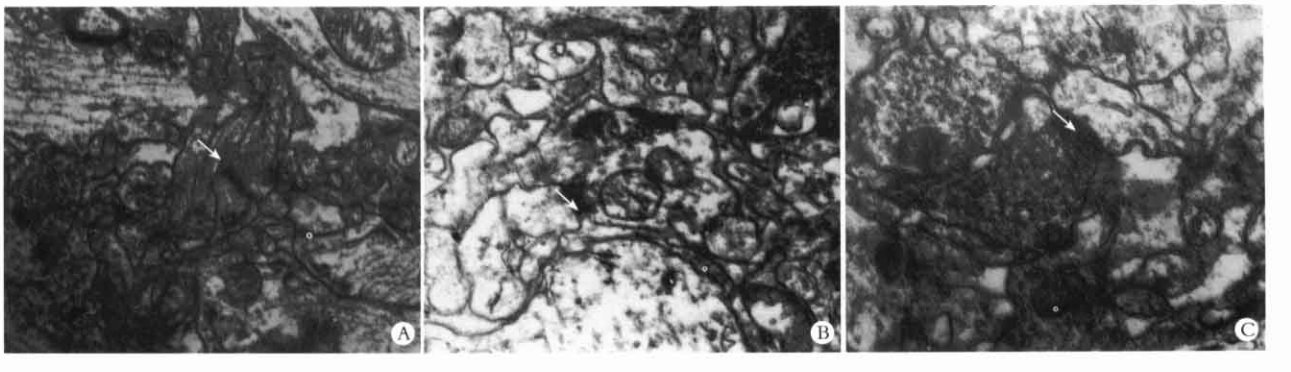
水平运动、垂直运动和修饰次数及大便粒数各项参数各组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

表 2　大鼠开场实验结果

组别	水平运动次数	垂直运动次数	修饰次数	大便粒数
N 组($n = 10$)	98.40 ± 51.55	11.20 ± 7.19	3.50 ± 2.27	1.20 ± 2.10
D 组($n = 10$)	96.33 ± 29.10	10.89 ± 5.56	2.89 ± 1.36	1.44 ± 1.33
T 组($n = 12$)	95.50 ± 22.81	10.20 ± 3.68	2.60 ± 0.97	2.30 ± 2.54

2.3　超微结构观察

透射电镜下糖尿病组(图 1B)与正常对照组(图 1A)比较,海马 CA1 区突触前终末内线粒体肿胀,突触呈弥漫性改变,突触结构模糊,突触前后膜轴浆溶解,形成空腔,突触小泡减少,突触后膜肿胀、变薄,突触间隙变窄,部分突触无法区分前后膜,轴浆里溶酶体增加。替米沙坦组(图 1C)较糖尿病组海马 CA1 区突触结构明显改善,突触前后结构清晰,突触间隙清晰可见、突触前膜小泡增加、线粒体结构完整。



A: 正常对照组:突触前后结构清晰,突触前膜小泡、突触间隙清晰可见; B: 糖尿病组:结构模糊,突触前后膜轴浆溶解,突触小泡减少,突触后膜肿胀、变薄,突触间隙变窄; C: 替米沙坦组:前后结构清晰,突触前膜小泡、突触间隙清晰可见 ↘:突触

图 1　大鼠海马 CA1 区电镜观察　(TEM ×30 000)

3 讨论

糖尿病脑病临床上以认知障碍为主要表现。已有研究证实糖尿病脑病与海马突触结构改变有关[7,8]。海马作为学习、记忆的重要解剖结构和神经中枢,与认知功能关系密切。而突触的性质、数量与学习记忆的过程及记忆的维持密切相关。在研究中,我们观察成模12周糖尿病大鼠海马突触超微结构发现海马CA1区突触出现了弥漫性破坏。行为学测试显示成模12周的糖尿病大鼠出现了与海马突触结构相关的空间认知功能障碍,与国外相关的研究结果一致[7,8]。因为临床上糖尿病易合并抑郁症,我们引入了抑郁症动物模型的经典筛选方法——Open-field实验[6],排除了抑郁症所致的思维迟钝、行动迟缓、情绪低落对Morris水迷宫测试结果的影响,使行为学结果更具可靠性和科学性。

电镜下我们发现替米沙坦组海马区除部分神经元变性、线粒体肿胀外,突触前后结构清晰,突触间隙清晰可见、突触前膜小泡增加、线粒体结构完整。替米沙坦组Morris水迷宫测试成绩明显提高,与糖尿病组比较潜伏期明显缩短,中心区停留时间百分比和通过原平台位置次数增加显著,甚至接近正常组,显示替米沙坦早期干预可以有效维持糖尿病大鼠海马突触结构完整性,改善与突触功能相关的学习记忆过程。

已有的研究表明ARB对糖尿病肾脏、心脏有保护作用[9,10],但对糖尿病脑病的防治作用少见类似报道。替米沙坦是选择性AT_1受体抑制剂,可完全阻滞肾素-血管紧张素系统,其特有异芳香基团修饰,药物的脂溶性较高,较其他ARB更易通过血脑屏障发挥作用。替米沙坦保护糖尿病大鼠海马突触结构和认知功能的机制目前尚不清楚,其可能的途径有:①突触的长程增强效应(Long-term potentiation,LTP)被公认为是学习记忆活动的细胞水平的生物学基础。AngⅡ能抑制突触重塑和长程增强效应产生,影响认知功能[2]。因此推测替米沙坦改善糖尿病大鼠认知功能可能与其减轻AngⅡ对突触重塑和LTP产生的抑制有关。②AngⅡ具有强烈的缩血管效应,ARB能竞争性地抑制AngⅡ与AT_1受体结合,扩张脑血管,增加脑血流量,改善脑代谢,抵抗高血糖对神经元细胞、突触的损害。③ARB可降低NADPH氧化酶的活性,有抗氧化应激作用[11];④ARB抑制AngⅡ与AT_1受体结合,AngⅡ与AT_2受体结合增加,减少神经细胞凋亡[12];⑤替米沙坦是过氧化物酶体增殖物激活受体γ(PPARγ)的部分激活剂,具有独立于降压作用以外的代谢改善作用,在糖代谢和脂代谢调节中具有重要作用[13],可能对糖尿病大鼠海马神经细胞及突触有潜在的保护作用。

综上所述,我们的研究结果显示糖尿病大鼠学习记忆能力下降与海马区突触结构有关,替米沙坦早期干预能有效阻止糖尿病所致海马突触形态结构的损害,延缓糖尿病大鼠学习记忆能力的衰退,为临床防治糖尿病脑病提供了新的方法和手段。但替米沙坦改善糖尿病大鼠突触结构和行为学表现的具体机制还有待进一步探讨。

参考文献:

[1] Biessels G J, van-der-Heide L P, Kamal A, *et al*. Ageing and diabetes: implications for brain function[J]. Eur J Pharmacol, 2002, 441(1-2): 1-14.

[2] Wright J W, Reichert J R, Davis C J, *et al*. Neural plasticity and the brain renin-angiotensin system[J]. Neurosci Biobehav Rev, 2002, 26(5): 529-552.

[3] Manschot S M, Biessels G J, Cameron N E, *et al*. Angiotensin converting enzyme inhibition partially prevents deficits in water maze performance, hippocampal synaptic plasticity and cerebral blood flow in streptozotocin-diabetic rats[J]. Brain Res, 2003, 966(2): 274-282.

[4] Junod A, Lambert A E, Stauffacher W, *et al*. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response[J]. J Clin Invest, 1969, 48(11): 2129-2139.

[5] Norte M C, Cosentino R M, Lazarini C A. Effects of methyl-eugenol administration on behavioral models related to depression and anxiety, in rats[J]. Phytomedicine, 2005, 12(4): 294-298.

[6] Mimura M, Yano M. Memory impairment and awareness of memory deficits in early-stage Alzheimer's disease[J]. Rev Neurosci, 2006, 17(1-2): 253-266.

[7] Trudeau F, Gagnon S, Massicotte G. Hippocampal synaptic plasticity and glutamate receptor regulation: influences of diabetes mellitus[J]. Eur J Pharmacol, 2004, 490(1-3): 177-186.

[8] Magarinos A M, McEwen B S. Experimental diabetes in rats causes hippocampal dendritic and synaptic reorganization and increased glucocorticoid reactivity to stress[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(20): 11056-11061.

[9] Li B, Yao J, Kawamura K, *et al*. Real-time observation of glomerular hemodynamic changes in diabetic rats: effects of insulin and ARB[J]. Kidney Int, 2004, 66(5): 1939-1948.

[10] Inamoto S, Hayashi T, Tazawa N, *et al*. Angiotensin-Ⅱ receptor blocker exerts cardioprotection in diabetic rats exposed to hypoxia[J]. Circ J, 2006, 70(6): 787-792.

[11] Kusaka I, Kusaka G, Zhou C, *et al*. Role of AT1 receptors and NAD(P)H oxidase in diabetes-aggravated ischemic brain injury[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 286(6): H2442-H2451.

[12] Jing G, Grammatopoulos T, Ferguson P *et al*. Inhibitory effects of angiotensin on NMDA-induced cytotoxicity in primary neuronal cultures[J]. Brain Res Bull, 2004, 62(5): 397-403.

[13] Erbe D V, Gartrell K, Zhang Y L *et al*. Molecular activation of PPAR-gamma by angiotensin Ⅱ type 1-receptor antagonists[J]. Vascul Pharmacol, 2006, 45(3): 154-162.

(编辑 陈聪连)