论著

文章编号:1000-5404(2008)14-1342-04

替米沙坦对糖尿病大鼠认知功能及大脑皮质 Ghrelin 受体表达的影响

张海娜[1],高 原[1],吴绮楠[2],肖 谦[1] ([1]重庆医科大学附属第一医院老年科,重庆 400016;[2]第三军医大学西南医院内分泌科,重庆 400038)

摘 要:目的 观察替米沙坦对糖尿病大鼠认知功能和大脑皮质 Ghrelin 受体 GHSR 的表达影响。**方法** 将 40 只大鼠分为正常对照组、糖尿病组、替米沙坦组。建立 STZ 糖尿病大鼠模型,替米沙坦干预 12 周,Morris 水迷宫测试其认知能力。RT-PCR 检测大脑皮质 GHSR mRNA 水平表达变化,免疫组化观察大鼠大脑皮质 GHSR 蛋白的表达。**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($P<0.05$),免疫组化显示 GHSR 蛋白表达增加($P<0.05$),RT-PCR 显示 GHSR 在 mRNA 水平表达增加($P<0.05$)。**结论** 糖尿病引起大鼠认知功能下降和 GHSR 表达下降,GHSR 下降可能与认知障碍有关。早期替米沙坦治疗可使糖尿病大鼠认知功能和海马 GHSR 表达接近正常。

关键词: 替米沙坦;糖尿病;GHSR;认知功能

中图法分类号: R587.1;R749.24;R972.4 **文献标识码:** A

Effects of telmisartan on cognition and GHSR expression in frontal cortex of diabetic rats

ZHANG Hai-na[1], GAO Yuan[1], WU Qi-nan[2], XIAO Qian[1] ([1]Department of Gerontology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016; [2]Department of Endocrinology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effects of telmisartan on cogtive function and the expression of Ghrelin receptors, growth hormone secretagogues receptor(GHSR) in diabetic rats. Methods Forty rats were randomly divided into 3 groups: control group, diabetic model group, and telmisartan treatment group. Streptozotocin-induced diabetic rat model(65 mg/kg, ip) was established. In the telmisartan treatment group, the rats were treated with telmisartan ($13.3\ mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$) for 12 weeks. Learning and memory abilities of the rats were tested by the Morris water maze. The mRNA and protein levels of GHSR in frontal cortex were detected by RT-PCR and immunohistochemistry. Results Compared with the diabetic model group, the telmisartan treatment group showed a significant decrease in the mean time of escape latencies($P<0.05$) and an increased percentage of time spent in the central area and the more times navigating the original platform position($P<0.05$). The mRNA and protein expressions of GHSR were elevated significantly in frontal cortex($P<0.05$). Conclusion The cognitive dysfunctions induced by diabetes may be correlated with the decrease of GHSR and can be alleviated with telmisartan.

Key words: telmisartan; diabetes; growth hormone secretagogues receptor; cognitive ability

研究表明,糖尿病是痴呆发生的危险因素[1]。糖尿病患者晚期出现认知功能障碍,目前糖尿病认知障碍的发病机制尚不明确。Ghrelin 是 1999 年发现的一种新的脑肠肽激素,与糖尿病关系密切[2]。最近研究

作者简介:张海娜,女,河南省淮阳县人,硕士研究生,医师,主要从事糖尿病慢性并发症方面的研究。E-mail: hainazhangsky@126.com.cn.

通信作者:肖 谦,电话:(023)89012962

收稿日期:2007-11-06;修回日期:2008-02-08

表明 Ghrelin 同其受体——生长激素促分泌素受体(growth hormone secretagogues receptor, GHSR)结合可以提高阿尔茨海默病(AD)SAMP8 小鼠的认知功能[3]。一些研究证实,肾素-血管紧张素系统(renin angiotensin system,RAS)与记忆密切相关[4]。血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂——替米沙坦可以改善因高血压导致认知障碍患者的认知功能[6]。本实验观察替米沙坦对糖尿病大鼠认知行为及大脑皮质 GHSR-1a 表达的影响,进一步探讨糖尿病认知障碍的发病机制以及替米沙坦的预防和治疗作用。

1　材料与方法

1.1　试剂和药物

链脲佐菌素(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),羊抗大鼠 GHSR-1a 多克隆抗体(sc-10359)(美国 Santa Cruz 公司)。DAB 显色剂及 S-P 免疫组化试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),RT-PCR 试剂盒(大连宝生物工程有限公司)。Trizol:上海生工生物工程技术服务有限公司。引物合成:赛百盛基因工程有限公司。

1.2　实验动物

成年 Wistar 雄性大鼠 40 只,体质量 180 ~ 200 g,8 ~ 10 周龄,采用 STZ(streptozotocin-induced diabetic rats)糖尿病模型。大鼠禁食 12 h,糖尿病组和替米沙坦组按 65 mg/kg 剂量腹腔一次注射 1% STZ(溶于 pH 4.2,0.1 mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液),正常对照组注射等量缓冲液。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。糖尿病成模大鼠 30 只,分为 2 组:糖尿病组和替米沙坦组各 15 只,设置正常对照组 10 只。替米沙坦组成模同时给予替米沙坦 13.3 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$灌胃,治疗 12 周;正常对照组和糖尿病组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　Morris 水迷宫(Morris water maze)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。成模第 12 周,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。

1.4　开野实验(open-field test)[6]

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 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。

1.5　免疫组织化学

取大脑皮质石蜡包埋,连续冠状切片,按中杉 S-P 试剂盒说明检测 GHSR 在大脑皮质的表达。具体过程如下:常规脱蜡至水,热修复后,0.1% 胰蛋白酶 37 ℃孵育 10 min。3% 过氧化氢灭活内源性酶,正常兔血清封闭,羊抗大鼠 GHSR-1a 一抗(1∶100)4 ℃过夜,生物素化兔抗山羊 IgG 25 ℃孵育 2 h,辣根素过氧化物酶 37 ℃孵育 25 min,室温下 DAB 显色,镜下控制反应时间,以阳性产物呈棕黄色,背景淡棕色为度。苏木精复染,显微镜观察,照相。Image-Pro Plus 6.0 进行图像分析统计处理,分析 5 张切片,每张切片分析 5 个视野,计算平均光密度。

1.6　RT-PCR 法

大鼠断头,低温下快速取出大脑额叶皮质,于液氮冻存。称取 50 mg 大脑额叶皮质,提取总 RNA,进行 RT-PCR。β-actin 引物序列为:上游引物 5′-CTGCCGCATCCTCTTCCTC-3′,下游引物 5′-CTCCTGCTTGCTGATCCACAT-3′。GHSR-1a 引物序列为:上游引物 5′-GAGCCTAACGTCACGTTG-3′,下游引物 5′-AGGCAGAAGACCGGTAGA-3′。条件:预变性:94 ℃ 2 min;变性:94 ℃,30 s;退火:GHSR-1a 53 ℃(β-actin 56 ℃)30 s;72 ℃延伸 30 s,30 个循环;72 ℃再延伸 6 min。取 PCR 产物 5 μl 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定,照相记录。凝胶成像分析系统扫描 RT-PCR 电泳结果,用 Quantity One 软件测定 Volume(INT*mm^2)值,计算 GHSR/β-actin 比值。

1.7　统计学处理

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.5 统计分析软件进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　Morris 水迷宫测试结果

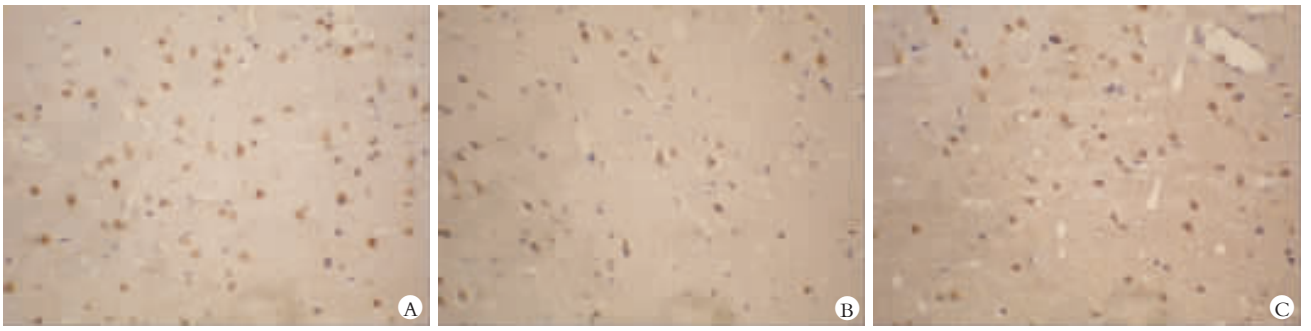
2.1.1　隐藏平台获得实验　　糖尿病组潜伏期增加,与正常对照组比较差异有显著性($P < 0.05$)。替米沙坦组较糖尿病组潜伏期明显缩短($P < 0.05$),较正常对照组稍延长,但无统计学差异($P > 0.05$),见表 1。

表 1　正常对照组、糖尿病组、替米沙坦组空间搜索实验数据/隐蔽平台搜索实验结果($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	中心区域(%)	穿越目标区次数	逃避潜伏期(s)
正常对照组	10	25.26 ± 2.80	3.31 ± 0.24	15.20 ± 2.63
糖尿病组	10	17.20 ± 5.26[a]	2.25 ± 0.22[a]	30.02 ± 3.33[a]
替米沙坦组	12	23.21 ± 2.10[b]	3.30 ± 0.14[b]	13.61 ± 2.52[b]

a: $P < 0.05$,与正常对照组比较; b: $P < 0.05$, 与糖尿病组比较

2.1.2　空间搜索实验　　糖尿病组与正常对照组相比,中心区停留时间百分比和通过原平台位置次数较明显下降($P < 0.05$);替米沙坦组较糖尿病组明显增加($P < 0.05$),与正常对照组比较无统计学差异($P > 0.05$),见表 1。



A:正常组; B:糖尿病; C: 替米沙坦组

图1 大鼠大脑皮质 GHSR-1a 免疫组化结果 (S-P×400)

2.2 开野实验结果

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显著性($P>0.05$,表2)。

表2 正常对照组、糖尿病组、替米沙坦组开野实验结果($\bar{x}\pm s$)

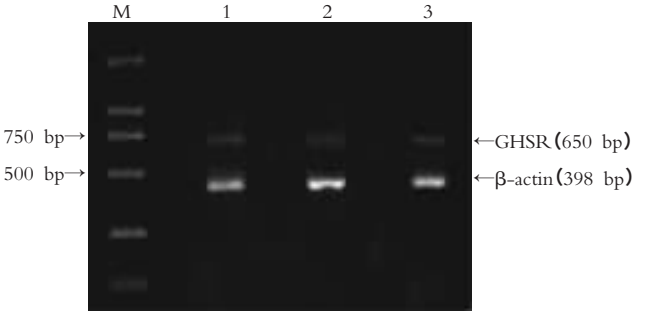
组别	例数	水平运动次数	垂直运动次数	修饰次数	大便粒数
正常对照组	10	97.40±50.55	11.18±7.23	3.50±2.27	1.150±2.04
糖尿病组	10	94.23±28.20	10.09±5.34	2.69±1.34	1.40±1.23
替米沙坦组	12	96.45±40.20	11.08±5.10	2.93±2.12	1.15±2.15

2.3 免疫组织化学结果

糖尿病组大脑皮质 GHSR-1a 阳性神经元光密度降低,与正常对照组比较有显著性差异($P<0.05$)。替米沙坦组与糖尿病组比较,上述指标显著增加($P<0.05$),但与正常对照组比较无明显差异($P>0.05$,表3,图1)。

2.4 GHSR-1a mRNA 的表达

糖尿病组大脑皮质 GHSR-1a 的表达明显下降($P<0.05$),经替米沙坦治疗后可显著提高 GHSR-1a 表达水平($P<0.05$,表3,图2)。



M: 标准; 1:正常对照组; 2: 糖尿病组; 3:替米沙坦组

图2 各组大鼠大脑皮质中 GHSR-1a mRNA 表达比较

表3 正常对照组、糖尿病组、替米沙坦组大脑皮质 GHSR-1a 蛋白及 mRNA 表达($\bar{x}\pm s$)

组别	平均光密度	GHSR/β-actin
正常对照组	0.22±0.02	0.52±0.03
糖尿病组	0.18±0.01[a]	0.42±0.03[a]
替米沙坦组	0.21±0.01[b]	0.50±0.02[b]

a: $P<0.05$,与正常对照组比较; b: $P<0.05$, 与糖尿病组比较

3 讨论

糖尿病中枢神经系统的病变-糖尿病脑病(diabetic encephalopathy)正逐渐成为基础和临床相关学科的研究热点。

研究已证实,额叶皮层与工作记忆之间存在紧密的联系[7]。大脑额叶皮质是缺血敏感区,缺血后易导致神经元变性坏死,出现认知障碍。GHSR 分为2个亚型:GHSR-1a 及 GHSR-1b。研究表明,功能性受体 GHSR-1a 除在下丘脑、海马结构和垂体有丰富表达外,大脑皮质也有表达[8]。Diano 等[3]研究发现 Ghrelin 结合 GHSR-1a 后可以提高阿尔茨海默病 SAMP8 小鼠的认知功能。Liu 等[9]研究发现,Ghrelin 可以提高脑缺血再灌注大鼠模型神经元的存活率及抑制神经元的凋亡。Miao 等[10]应用免疫组化方法对局部缺血再灌注的大鼠研究发现,大鼠皮质受损时,Ghrelin 受体(GHSR-1a)表达显著下降,给予 Ghrelin 后大鼠皮质 GHSR-1a 表达增加,表明 GHSR-1a 的表达上调可能参与了 Ghrelin 的神经保护作用。本课题组已有电镜研究结果证实替米沙坦早期干预糖尿病大鼠能有效阻止海马突触形态结构的损害,但替米沙坦改善突触超微结构的具体机制尚未明确[6]。为进一步探讨替米沙坦的脑保护作用的机制,本实验着重研究替米沙坦改善糖尿病大鼠认知功能时大脑皮质GHSR-1a 的表达及其与认知功能的关系。

临床上糖尿病易合并抑郁症,为此本研究引入抑郁症动物模型的经典筛选方法——open-field 实验[11],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。实验结果显示,成模12周后,糖尿病大鼠 Morris 水迷宫测试潜伏期较正常对照组明显增加,中心区停留时间百分比和通过原平台位置次

数较正常对照组显著下降,表明糖尿病大鼠学习和记忆能力出现减退。替米沙坦组大鼠较糖尿病大鼠 Morris 水迷宫测试成绩明显好转。免疫组化技术均观察到各组大鼠大脑皮质 GHSR-1a 阳性神经元的表达,其中糖尿病组阳性神经元减少。RT-PCR 及免疫组化半定量分析结果显示:糖尿病大鼠大脑皮质 GHSR-1a 表达量较正常组明显下降($P<0.05$),替米沙坦组较糖尿病组大脑皮质 GHSR-1a 的表达增加($P<0.05$),接近正常对照组水平($P>0.05$)。实验结果显示糖尿病大鼠认知能力下降及大脑皮质 GHSR 表达量下降,替米沙坦上调 GHSR-1a 的表达可能是其改善糖尿病大鼠认知障碍的机制之一。

替米沙坦特有异芳香基团修饰,脂溶性较高,因而具有较强的组织穿透力和作用特异性,较其他血管紧张素受体阻断剂(ARB)更易通过血脑屏障发挥作用。替米沙坦上调糖尿病大鼠大脑皮质 GHSR-1a 的表达改善认知功能的机制尚不明确,可能的机制有:①血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)能抑制突触重塑和长时程增强效应,影响认知功能[3],而突触 LTP 效应被公认为是学习记忆活动的细胞水平的生物学基础,替米沙坦改善糖尿病大鼠认知功能可能与减轻 AngⅡ对突触重塑和 LTP 产生的抑制有关。②替米沙坦抑制 AngⅡ与 ATI 受体结合,AngⅡ与 ATⅡ受体结合增加,减轻局部脑缺血及神经元凋亡[10,12]。

Kario 等[13]对患有糖尿病高血压(DHTs)和仅患有高血压(HTs)的老年患者研究证实,ARB 类药——坎地沙坦治疗 3~4 个月后,显著恢复 DHTs 患者的脑血流量的程度超过对 HTs 患者的改变。研究结果提示,RAS 可能是高血压尤其是糖尿病高血压疾病脑血管受损的致病因素,ARB 药物可以恢复脑血流的灌注,减轻脑损伤,这是独立于其降血压作用之外的脑保护作用。替米沙坦是唯一可以激活过氧化物酶增殖物活化受体-γ(PPAR-γ)作用的 ARB 类药物,它通过选择性刺激 PPAR-γ 基因而使其明显活化,从而促进胰岛素敏感性增强,进而改善糖代谢[14]。替米沙坦在糖尿病心脏、肾脏、心血管等方面的保护作用国内外已有较多报道。本实验结果提示可考虑替米沙坦来防治糖尿病患者的认知障碍,具体的应用有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Biessels G J, Kappelle L J. Increased risk of Alzheimer's disease in Type Ⅱ diabetes: insulin resistance of the brain or insulin-induced amyloid pathology? [J]. Biochem Soc Trans, 2005, 33(Pt 5): 1041 - 1044.

[2] Irako T, Akamizu T, Hosoda H, *et al*. Ghrelin prevents development of diabetes at adult age in streptozotocin-treated newborn rats[J]. Diabetologia, 2006, 49(6): 1264 - 1273.

[3] Diano S, Farr S A, Benoit S C, *et al*. Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance[J]. Nat Neurosci, 2006, 9(3): 381 - 388.

[4] 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.

[5] Fogari R, Mugellini A, Zoppi A, *et al*. Effect of telmisartan/hydrochlorothiazide *vs* lisinopril/hydrochlorothiazide combination on ambulatory blood pressure and cognitive function in elderly hypertensive patients[J]. J Hum Hypertens, 2006, 20(3): 177 - 185.

[6] 高　原, 肖　谦, 赵柯湘, 等. 替米沙坦对糖尿病大鼠认知功能的保护作用[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(15): 1514 - 1516.

[7] Bussey T J, Wise S P, Murray E A. The role of ventral and orbital prefrontal cortex in conditional visuomotor learning and strategy use in rhesus monkeys (Macaca mulatta)[J]. Behav Neurosci, 2001, 115(5): 971 - 982.

[8] Hou Z, Miao Y, Gao L, *et al*. Ghrelin-containing neuron in cerebral cortex and hypothalamus linked with the DVC of brainstem in rat[J]. Regul Pept, 2006, 134(2 - 3): 126 - 131.

[9] Liu Y, Wang P S, Xie D, *et al*. Ghrelin reduces injury of Hippocampal neurons in a rat model of cerebral ischemia/reperfusion[J]. Chin J Physiol, 2006, 49(5): 244 - 250.

[10] Miao Y, Xia Q, Hou Z, *et al*. Ghrelin protects cortical neuron against focal ischemia/reperfusion in rats[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 359(3): 795 - 800.

[11] 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.

[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] Kario K, Ishikawa J, Hoshide S, *et al*. Diabetic brain damage in hypertension: role of renin-angiotensin system[J]. Hypertension, 2005, 45(5): 887 - 893.

[14] Benson S C, Pershadsingh H A, Ho C I, *et al*. Identification of telmisartan as a unique angiotensin Ⅱ receptor antagonist with selective PPARgamma-modulating activity[J]. Hypertension, 2004, 43(5): 993 - 1002.

(编辑　邓强庭)