论著

文章编号:1000-5404(2011)03-0282-04

姜黄素对糖尿病脑病大鼠海马IGF-1表达及认知功能影响

胡义平,魏倩萍,陈艳瑜 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院老年科)

【摘要】 **目的** 观察姜黄素对糖尿病脑病大鼠学习记忆、胰岛素样生长因子1(IGF-1)表达的影响,分析姜黄素的脑保护作用机制。**方法** 40只SD大鼠,随机数字表法选取30只,一次性腹腔注射链脲佐菌素(60 mg/kg)建立糖尿病脑病模型后,随机数字表法分成2组:糖尿病脑病组和姜黄素治疗组;其余大鼠也随机分为2组:正常对照组和正常姜黄素组,建模12周后,姜黄素[60 mg/(kg·d)]持续灌胃12周。第24周时Morris水迷宫观察大鼠认知功能变化,免疫组化、RT-PCR法观察IGF-1表达的变化。**结果** 与正常对照组和正常姜黄素组大鼠相比,糖尿病脑病组大鼠认知功能显著降低;海马区IGF-1表达明显减少($P<0.05$)。经姜黄素治疗后,大鼠认知功能得到改善,Morris水迷宫实验的逃避潜伏期,姜黄素治疗组[(34.90±1.81)s]显著短于糖尿病脑病组[(68.70±3.67)s]($P<0.01$);海马神经细胞数量增多,海马区IGF-1表达增多($P<0.05$)。**结论** 大鼠海马IGF-1表达的减少可能在糖尿病脑病发病机制中发挥着重要的作用,姜黄素有脑保护作用,其机制可能是通过调控IGF-1信号通路调节实现的。

【关键词】 糖尿病脑病;胰岛素样生长因子-1;姜黄素;认知功能

【中图法分类号】 R282.71;R587.2;R749.105 【文献标志码】 A

Effect of curcumin on expression of IGF-1 in hippocampal nerve cells of rats with diabetic encephalopathy and their cognitive function

Hu Yiping, Wei Qianping, Chen Yanyu (Department of Gerontology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【**Abstract**】 **Objective** To study the effect of curcumin on expression of IGF-1 in rats with diabetic encephalopathy and their memory and its cerebral protective mechanism. **Methods** A rat diabetic encephalopathy model was established by injecting streptozotocin (60 mg/kg). Thirty rats were randomly divided into diabetic encephalopathy group and curcumin treatment group. Another 10 rats were randomly divided into normal control group and normal curcumin group. Twelve weeks after diabetic encephalopathy model was established, gastric lavage was performed with curcumin [60 mg/(kg·d)] for 12 weeks. Twenty-four weeks later, cognitive function of rats was observed in Morris water maze experiment. Expression of IGF-1 was detected by immunohistochemistry method and RT-PCR, respectively. **Results** The cognitive function and IGF-1 expression levels were significantly lower in diabetic encephalopathy group than in normal control group and normal curcumin group ($P<0.05$). After treatment with curcumin, the cognitive function of rats was improved, the latent period of escaping from Morris water maze experiment was significantly shorter in curcumin treatment group than in diabetic encephalopathy group (34.90±1.81 s *vs* 68.70±3.67 s, $P<0.05$), the number of nerve cells and the expression of IGF-1 were increased in hippocampal region of rats ($P<0.05$). **Conclusion** The decreased expression of IGF-1 in hippocampal nerve cells of rats may play an important role in the pathogenesis of diabetic encephalopathy. Curcumin protects brain of rats against diabetic encephalopathy by regulating the IGF-1 signal pathway.

【**Key words**】 diabetic encephalopathy; IGF-1; curcumin; cognitive function

Corresponding author: Wei Qianping, Tel: 86-23-89012231, E-mail: wqp68894940@163.com

【通信作者】 魏倩萍,电话:(023)89012231,E-mail:wqp68894940@163.com

糖尿病脑病是糖尿病的主要并发症之一，以认知障碍和大脑的神经生理及结构改变为主要特点，严重的危害了人类健康[1-2]。其发病机制尚未清楚，近年研究发现IGF-1信号通路可能参与糖尿病脑病的发生[3-4]。姜黄素是从姜黄根茎中提取的一种酚性色素，有降低氧化应激、抑制细胞凋亡、抗肿瘤、抗炎等作用[5-8]。研究发现姜黄素可改善STZ大鼠认知功能。本实验通过姜黄素干预动物模型，观察糖尿病脑病大鼠海马神经元IGF-1表达的变化，初步探讨姜黄素对糖尿病脑病的作用机制，为临床上治疗糖尿病脑病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

成年3月龄SPF级健康SD大鼠（$n=40$，体质量200～250 g），由重庆医科大学实验动物中心提供。STZ和姜黄素（Sigma公司）；兔抗大鼠IGF-1抗体、羊抗兔IgG（武汉博士德公司）；RT-PCR试剂盒、琼脂糖、TAE（TaKaRa公司）；氯仿、异丙醇等（重庆医科大学设备科）；水迷宫程序自动控制仪（重庆市神经病学重点实验室）。

1.2 动物分组

40只SD大鼠适应性饲养1周，禁食12 h后，随机选取30只，予STZ[0.1 mol/L柠檬酸钠缓冲液（pH=4.5）稀释]60 mg/kg一次性腹腔注射。72 h之后，取尾静脉血测血糖，将空腹血糖≥16.7 mmol/L、尿糖持续阳性大鼠定为糖尿病模型动物。饲养至12周时，剔除不符合诊断标准及死亡大鼠10只后，成模大鼠共20只，并随机数字表法分2组：糖尿病脑病组（$n=10$）和姜黄素治疗组（$n=10$）。其余10只大鼠予等剂量柠檬酸钠缓冲液腹腔注射后，饲养至12周时也随机分两组：正常对照组（$n=5$）和正常姜黄素组（$n=5$）。姜黄素治疗组和正常姜黄素组大鼠予以姜黄素60 mg/（kg·d）持续12周灌胃，糖尿病脑病组和正常对照组大鼠用等量的羧甲基纤维素灌胃。实验结束时各组大鼠剩余数量分别为：正常对照组（$n=5$），正常姜黄素组（$n=5$），糖尿病脑病组（$n=7$）姜黄素治疗组（$n=8$）。实验过程大鼠分笼养于25 ℃恒温清洁级动物房内中，每天予以光照12 h，自由饮水，自由摄食，未做任何降糖处理。各组实验动物每周测体质量、血糖。

1.3 生化指标的检测

大鼠血糖、HbA1c的测定。血糖采用血糖仪测法，HbA1c采用高效液相色谱法。

1.4 认知功能检测

Morris水迷宫试验采用电脑全自动启程（水温24～25 ℃），训练第1天先将大鼠放到平台上适应1 min，让其自由游泳到平台，3 min内未找到平台者，试验者协助将其引导至平台。从第2天起每天分上下午分段训练，每段训练4次，每次训练时选择一个入水点，将大鼠面向池壁放入水中，让大鼠进行定向航行，持续训练4 d。记录大鼠寻找平台所用时间。

1.5 取材

水迷宫实验后，从每组随机抽取3只，用10%的水合氯醛3 ml/kg腹腔注射，麻醉后打开胸腔暴露心脏，剪开右心耳，经左心室插管取血后，快速灌注生理盐水，再用4%的多聚甲醛先快后慢灌注。冰台上断头取脑，剥离海马组织，置于4%的多聚甲醛中固定。其余动物麻醉后直接断头取脑，置于液氮中保存。

1.6 脑组织切片和染色

1.6.1 HE染色 常规石蜡切片脱蜡至水化，苏木精溶液染色数分钟，酸水及氨水中分色，各数秒钟，70%、90%酒精脱色各10 min，用酒精伊红染液染3 min，脱水、透明、封片。

1.6.2 免疫组化法检测大鼠海马CA1区IGF-1的表达 3% H_2O_2室温孵育10 min，柠檬酸缓冲液热修复抗原15 min，山羊血清37 ℃封闭10 min，继之用兔抗大鼠IGF-1抗体（1∶50）4 ℃孵育过夜。充分洗涤后用生物素标记的二抗37 ℃孵育，滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液，最后DAB显色5 min。染色设PBS（代替一抗）做阴性对照。Imagine pro plus软件测定其IOD值。

1.7 RT-PCR检测IGF-1 mRNA的表达

组织RNA按常规方法提取定量后，采用RT-PCR检测IGF-1 mRNA的表达，选择β-actin做内参照。引物序列：IGF-1上游：5′-GACCAGAGACCCTTTGCG-3′，下游：5′-GATCACAGCTCCGGAAGA-3′，预扩增长度236 bp；β-actin上游：5′-CCAAGGCCAACCGCGAGAAGATGAC-3′，下游引物序列：5′-AGGGTACATGGTGGTGC CGCCAGAC-3′，预扩增长度535 bp。上述引物由上海生工生物有限公司设计合成。Quantity one软件测定IGF-1/β-actin的相对表达量。

1.8 统计学分析

采用SPSS 17.0软件进行统计处理，计量资料采用$\bar{x}\pm s$表示，组间行单因素方差分析。

2 结果

2.1 一般观察

糖尿病脑病组大鼠明显表现为多饮、多尿、多食，毛色灰黄，精神萎靡，行动缓慢，一般状况差。生长较正常对照组和正常姜黄素组缓慢，体质量变化不大。姜黄素治疗组大鼠一般情况较糖尿病脑病组好。

2.2 大鼠体质量、血糖、糖化血红蛋白的变化

造模前各组大鼠体质量、血糖无显著差异（$P>0.05$）。12周后，糖尿病脑病组大鼠体质量明显低于正常对照组，而血糖显著高于正常对照组（$P<0.01$）。24周时，姜黄素治疗组大鼠体质量明显增加（$P<0.01$），血糖却无明显变化（$P=0.163$），HbA1c较糖尿病脑病组明显降低（$P<0.05$），而正常姜黄素组与正常对照组大鼠体质量、血糖无明显区别（P值分别为0.538、0.782），见表1、2。

表1 各组大鼠体质量的比较（g，$\bar{x}\pm s$）

组别	n	0周	12周	24周
正常对照组	5	215.66±2.94	341.08±5.94	453.82±8.50
正常姜黄素组	5	217.82±1.76	338.14±3.68	444.40±8.47
糖尿病脑病组	7	218.48±4.82	228.69±3.07[a]	253.54±10.32[a]
姜黄素治疗组	8	218.45±3.68	226.27±5.36[a]	313.20±15.20[ab]

a：$P<0.01$，与正常对照组、正常姜黄素组比较；b：$P<0.01$，与糖尿病脑病组比较

表2 各组大鼠血糖、HbA1c的比较（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	血糖(mmol/L)			HbA1c(%)
		0周	12周	24周	24周
正常对照组	5	4.98±0.28	5.56±0.33	6.30±0.40	4.59±0.22
正常姜黄素组	5	5.40±0.20	5.87±0.27	5.96±5.29	4.79±0.30
糖尿病脑病组	7	5.65±0.29	23.71±3.10[a]	27.46±6.64[a]	8.87±0.35[a]
姜黄素治疗组	8	5.38±0.33	23.31±2.02[a]	25.54±2.35[a]	5.33±0.21[ab]

a：$P<0.01$，与正常对照组、正常姜黄素组比较；b：$P<0.01$，与糖尿病脑病组比较

2.3 水迷宫实验结果

姜黄素治疗后，姜黄素治疗组大鼠逃避潜伏期明显低于糖尿病脑病组（$P<0.01$），而正常对照组、正常姜黄素组无明显差异（$P=0.608$），见表3。

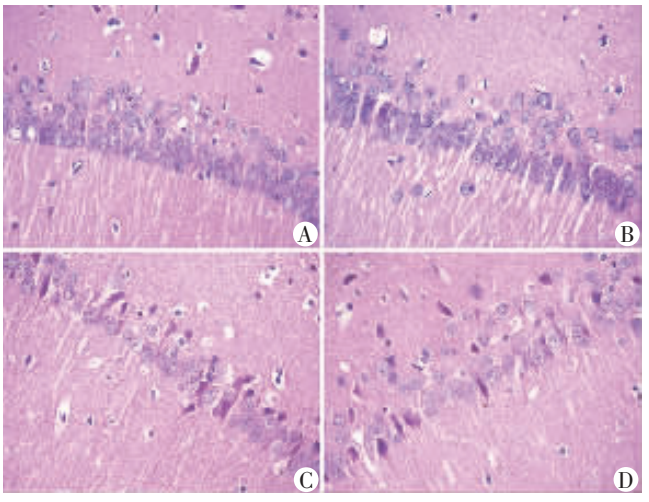
表3 各组大鼠水迷宫及免疫组化实验结果（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	逃避潜伏期(s)	海马区IGF-1 IOD值
正常对照组	5	18.90±0.99	236 797.37±20 415.61
正常姜黄素组	5	20.50±1.15	221 527.84±15 776.80
糖尿病脑病组	7	68.70±3.67[a]	114 829.72±10 561.61[a]
姜黄素治疗组	8	34.90±1.81[ab]	159 306.65±2 902.974[ab]

a：$P<0.01$，与正常对照组、正常姜黄素组比较；b：$P<0.01$，与糖尿病脑病组比较

2.4 大鼠海马HE染色观察结果

正常对照组与正常姜黄素组大鼠海马CA1区神经细胞排列整齐、紧密，胞体圆形。糖尿病脑病组大鼠海马CA1区神经细胞数量减少，大量胶质细胞增生，姜黄素治疗组大鼠海马CA1区神经细胞排列疏松，与糖尿病脑病组比较，胶质细胞数量减少（图1）。

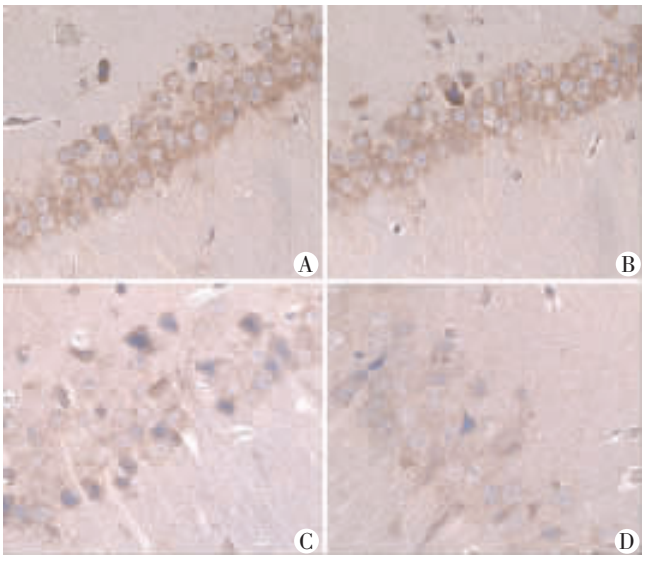


A：正常对照组；B：正常姜黄素组；C：糖尿病脑病组；D：姜黄素治疗组

图1 各组大鼠海马CA1区HE染色观察 （×400）

2.5 免疫组化结果

IGF-1在海马神经元中成棕黄色为阳性。正常对照组海马神经元中可见棕黄色异染颗粒；糖尿病脑病组棕黄色异染颗粒明显减少（$P<0.01$），姜黄素治疗后，姜黄素治疗组棕黄色异染颗粒明显增加，亦有显著性差异（$P<0.01$）；但正常对照组与正常姜黄素组无统计学意义（$P=0.456$）（图2、表3）。

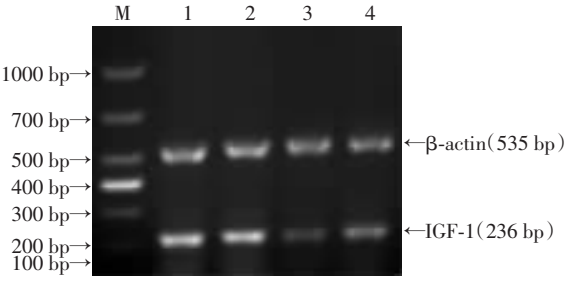


A：正常对照组；B：正常姜黄素组；C：糖尿病脑病组；D：姜黄素治疗组

图2 各组大鼠海马CA1区海马IGF-1的表达 （S-P ×400）

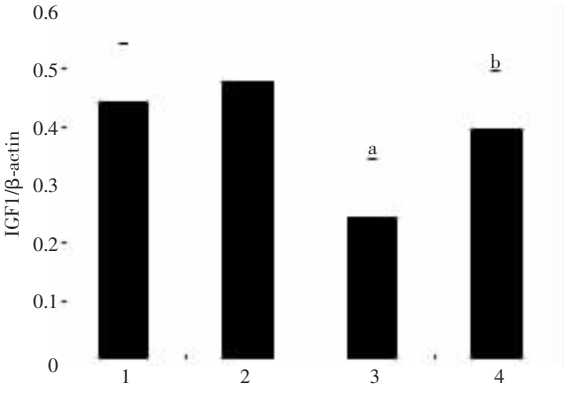
2.6 PT-PCR结果 海马区IGF-1 mRNA的表达变化

糖尿病脑病组大鼠海马区IGF-1mRNA的表达明显低于正常对照组和正常姜黄素组（$P<0.01$），姜黄素治疗后，姜黄素治疗组大鼠海马区IGF-1mRNA的表达明显增高（$P=0.037$），正常对照组和正常姜黄素组无明显差异（$P=0.684$），见图3、4。



M：标准（1 000 bp）；1：正常对照组；2：正常姜黄素组；3：糖尿病脑病组；4：姜黄素治疗组

图3 RT-PCR检测各组大鼠海马IGF-1 mRNA的表达



1：正常对照组；2：正常姜黄素组；3：糖尿病脑病组；4：姜黄素治疗组

a：$P<0.01$，与正常对照组、正常姜黄素组比较；b：$P<0.05$，与糖尿病脑病组比较

图4 各组大鼠海马IGF-1/β-actin相对表达量

3 讨论

糖尿病脑病患者主要表现轻、中度认知功能障碍，1型糖尿病患者认知功能损害主要表现在联想记忆和学习技能注意力方面。IGF-1广泛存在于脑组织中，特别是海马组织，在神经元生长、分化、能量代谢、神经保护等方面起重要作用[9-10]。IGF-1与受体结合，激活下游信号MAPK及PI3K传导：也可直接抑GSK3β的活性，从而抑制凋亡，促进细胞存活，可用于改善动物和人认知障碍。Ishii等研究发现IGF-1对STZ大鼠有神经保护作用，在糖尿病脑病的形成发挥重要作用[11]。糖尿病脑病初期IGF-1的表达是增加的，随着病程的进展而逐渐减少，因此IGF-1表达的变化与糖尿病脑病的发生及进展有密切关系[12]。本实验结果显示，24周模型组大鼠海马CA1区IGF-1的表达较正常对组明显减少，大鼠逃避潜伏期显著延长。因此，调控IGF-1的表达对糖尿病脑病患者有重要的意义。

姜黄素具有很多潜在的应用价值，可以改善糖尿病脑病认知功能。研究发现姜黄素可以改善STZ大鼠的认知障碍，神经保护作用可能是增强IGF-1信号通路实现的[13-15]。在糖尿病发病早期，神经元已出现退行性改变，大鼠脑部海马和皮质已经出现了实质性的变化即星形胶质增生。本实验姜黄素连续给药12周后，糖尿病脑病组大鼠海马CA1区IGF-1的表达明显增多，大鼠的认知功能也得到改善。海马区神经细胞增多，星形胶质增生减少，HbA1c得到良好控制，然而值得注意的是其血糖改善却不明显。ADA确定HbA1c是反映血糖控制的金标准，当HbA1c＜7%时，能减少糖尿病患者并发症的发生，所以临床上监测HbA1c对糖尿脑病患者更有意义[16]，但血糖的控制不容忽视。Ferguson等[17]报道，T1DM患者合并微血管病变，经常处高血糖状态更易出现认知障碍。所以，良好地控制血糖，特别是对合并微血管病变的1型糖尿患者有重要的意义。

综上所述，本实验中糖尿病脑病大鼠出现认知功能障碍，可能是IGF-1及表达量降低，继而下调了下游信号通路，导致神经元的凋亡；也可能是高血糖导致糖基化终末产物(AGEs)的形成增多，进而刺激了神经老化的发生[18]。姜黄素治疗后，海马IGF-1表达增加，推测姜黄素可能通过上调IGF-1的表达，调控下游信号通路抑制糖尿病脑病病情的发展，但其具体机制有待于进一步研究证实。

参考文献：

[1] Mijnhout G S, Scheltens P, Diamant M, *et al*. Diabetic encephalopathy: A concept in need of a definition[J]. Diabetologia, 2006, 49(6): 1447-1448.

[2] Li Z G, Zhang W, Sima A A. The role of impaired insulin/IGF action in primary diabetic encephalopathy[J]. Brain Res, 2005, 1037(1/2): 12-24.

[3] Xue H, Jin L, Zhang P, *et al*. Neuroprotection of aucubin in primary diabetic encephalopathy[J]. Sci China C Life Sci, 2008, 51(6): 495-502.

[4] Alvarez E O, Beauquis J, Revsin Y, *et al*. Cognitive dysfunction and hippocampal changes in experimental type 1 diabetes[J]. Behav Brain Res, 2009, 198(1): 224-230.

[5] Chainani-Wu N. Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (Curcuma longa)[J]. J Altern Complement Med, 2003, 9(1): 161-168.

[6] Aggarwal B B, Kumar A, Bharti A C. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies[J]. Anticancer Res, 2003, 23(1A): 363-398.

[7] 臧卫周，杨红旗，徐军，等. 姜黄素对缺氧复氧损伤PC12细胞的影响[J]. 郑州大学学报(医学版), 2009, 44(3): 594-596.

[8] 何航，华海婴，戈士文，等. 姜黄素对四氯化碳诱导大鼠肝纤维化的影响[J]. 郑州大学学报(医学版), 2009, 44(5): 986-990.

[9] Sharma S, Prasanthi R P J, Schommer E, *et al*. Hypercholesterolemia-induced Abeta accumulation in rabbit brain is associated with alteration in IGF-1 signaling[J]. Neurobiol Dis, 2008, 32(3): 426-432.

[10] Toth C, Brussee V, Zochodne D W. Remote neurotrophic support of epidermal nerve fibres in experimental diabetes[J]. Diabetologia, 2006, 49(5): 1081-1088.

[11] Ishii D N. Implication of insulin-like growth factors in the pathogenesis of diabetic neuropathy[J]. Brain Res Brain Res Rev, 1995, 20(1): 47-67.

[12] 贠国俊，郝青英. 胰岛素生长因子与脑损伤的研究进展[J]. 山西医药杂志, 2005, 34(4): 307-309.

[13] Agrawal R, Mishra B, Tyagi E, *et al*. Effect of curcumin on brain insulin receptors and memory functions in STZ (ICV) induced dementia model of rat[J]. Pharmacol Res, 2010, 61(3): 247-252.

[14] Isik A T, Celik T, Ulusoy G, *et al*. Curcumin ameliorates impaired insulin/IGF signalling and memory deficit in a streptozotocin-treated rat model[J]. Age (Dordr), 2009, 31(1): 39-49.

[15] Ishrat T, Hoda M N, Khan M B, *et al*. Amelioration of cognitive deficits and neurodegeneration by curcumin in rat model of sporadic dementia of Alzheimer's type (SDAT)[J]. Eur Neuropsychopharmacol, 2009, 19(9): 636-647.

[16] Bode B W. Glycemic variability and the role it should play in diabetes management and blood glucose monitoring[J]. US Endocrinol, 2009, 4(2): 67-70.

[17] Ferguson S C, Blane A, Perros P, *et al*. Cognitive ability and brain structure in type 1 diabetes: relation to microangiopathy and preceding severe hypoglycemia[J]. Diabetes, 2003, 52(1): 149-156.

[18] Ahmed N. Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2005, 67(1): 3-21.

(收稿 2010-09-04 修回 2010-11-12)
(编辑 汪勤俭)