文章编号:1000-5404(2013)24-2625-05

论著

糖尿病小鼠认知功能及不同时相点硫化氢的表达

戚韵雯,何选丽,朱丽娟,刘梦洁,晏 勇 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经内科,重庆市神经病学重点实验室)

[摘要] **目的** 观察糖尿病(DM)小鼠的认知功能及脑组织内硫化氢(H_2S)、胱硫醚-β-合成酶(CBS)的变化。**方法** 40只C57BL/6J小鼠分为正常组和模型组。通过长期给予小鼠高脂高糖饮食及腹腔注射链脲佐菌素(120 mg/kg)诱导2型糖尿病(T2DM)模型。T2DM模型组再分为4、8、12和16周4个时相点。Morris水迷宫实验检测各组小鼠认知改变,敏感硫电极法、免疫组化法测定皮质、海马内H_2S水平,CBS活性及蛋白表达等,并进行相关性分析。**结果** 与正常组相比,4周时T2DM小鼠定位导航实验的潜伏期开始延长($P<0.05$),8周时空间探索实验中平台所在象限停留时间百分率开始降低($P<0.01$);12、16周时皮质H_2S水平、CBS酶活性及CBS蛋白表达均降低($P<0.05$);8、12、16周时海马H_2S水平、CBS酶活性及CBS蛋白表达均显著减少($P<0.01$)。相关分析表明,皮质、海马H_2S含量及CBS活性与小鼠认知水平正相关。**结论** T2DM小鼠脑组织中H_2S含量、CBS酶活性及蛋白表达均减少,认知功能下降。推测内源性H_2S减少、CBS活性降低可能会引发及加重DM认知功能损害程度。

[关键词] 糖尿病;认知功能损害;硫化氢;胱硫醚-β-合成酶
[中图法分类号] R362;R587.102;R741 [文献标志码] A

Cognitive function and cerebral hydrogen sulfide content in diabetic mice

Qi Yunwen, He Xuanli, Zhu Lijuan, Liu Mengjie, Yan Yong (Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the changes of hydrogen sulfide (H_2S) and cystathionine-β-synthase (CBS) in brain tissues and cognitive function in diabetic mice. **Methods** Forty C57BL/6J mice were divided into a normal group and a model group. Mouse models of diabetes mellitus were established by high fat diet with intraperitoneal injection of medium dose streptozocin (STZ). Mouse models were subdivided into groups of 4, 8, 12 and 16 weeks. Changes of recognition were tested by Morris water maze. The gas level of H_2S, CBS activity and CBS expression in the brain tissue were detected by immunohistochemistry and sensitive sulfur electrode assay. Correlation analysis was conducted. **Results** Compared to the normal group, the latency of memory of mouse models started to increase at 4 weeks ($P<0.05$), while the percentage of total time left in the target quadrant began to decrease at 8 weeks ($P<0.01$). The gas level of H_2S, CBS activity and CBS expression in the cortex of the model mice at 12 and 16 weeks were significantly lower than that in normal mice ($P<0.05$). The gas level of H_2S, CBS activity and CBS expression in the hippocampus of the model mice were significantly decreased at 8, 12 and 16 weeks, as compared to the normal mice ($P<0.01$). It was revealed by correlation analysis that the gas level of H_2S and CBS activity were positively correlated with cognitive function. **Conclusion** The gas level of H_2S, CBS activity and CBS expression are decreased in diabetic mice, and the cognitive function declines as well. Reduction of endogenous H_2S and CBS activity may initiate or exacerbate diabetes mellitus cognitive impairment.

[**Key words**] diabetes mellitus; cognitive impairment; hydrogen sulfide; cystathionine-β-synthase

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81271222) and the Project of Chongqing Municipal Health Bureau (2010-1-17). Corresponding author: Yan Yong, Tel: 86-23-68485490, E-mail: yyanpro@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金(81271222);重庆市卫生局资助项目(2010-1-17)
[通信作者] 晏 勇,电话:(023)68485490,E-mail: yyanpro@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130917.1442.002.html(2013-09-17)

20世纪90年代,研究者发现自然界中具有臭鸡蛋味的有毒气体硫化氢(H_2S)在生物体内可以合成,且具有调节突触活动、增强海马长时程记忆(long term potentiation,LTP)[1]及舒张血管等多种生理作用,被认为是继一氧化氮和一氧化碳后的体内第3种气体信号分子[2]。研究发现,脑内H_2S的浓度可达50~160 μmol/L,阿尔茨海默病(Alzheimer disease,AD)患者脑内的H_2S水平约降低55%[3],AD患者血浆H_2S降低、同型半胱氨酸(Hcy)增高[4],说明AD患者血浆和脑组织均存在H_2S水平降低的现象。

2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus,T2DM)已成为中老年人群的高发病。T2DM患者常有认知功能障碍,以学习能力下降、记忆损害为主,严重者发展为痴呆,与脑老化及AD均有密切联系[5]。目前对T2DM发生认知功能障碍的机制尚不清楚,是否与H_2S含量减低有关?本实验建立T2DM小鼠模型,检测其皮质、海马内H_2S、CBS含量及认知功能变化,探讨T2DM认知功能与H_2S变化的相关性。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

链脲佐菌素(streptozotocin, induced diabetic rats, STZ),柠檬酸缓冲液,罗氏血糖仪和血糖试纸条;离子计(PXSJ-226)和敏感硫电极(PAg/S-1-01, 上海雷磁);BCA蛋白浓度测定试剂盒(碧云天P0010),CBS抗体(ab135626, Abcam公司);OLYMPUS-BX51正置荧光显微镜、Morris水迷宫及分析软件由重庆医科大学实验室提供。

1.2 实验动物分组及模型建立

4月龄C57BL/6J小鼠40只,体质量25~30 g(重庆医科大学实验动物室提供)。分为模型组和正常对照组。模型组动物以高脂高糖饲料喂养4周(饲料组成:10%猪油、20%蔗糖、2.5%胆固醇、1%胆酸盐、6.5%常规饲料),待诱导出胰岛素抵抗后,按120 mg/kg腹腔注射STZ诱发T2DM。分别在注射后3、7 d及2周后剪尾取血,血糖仪测定血糖,2周后血糖≥16.7 mmol/L为T2DM模型成功。建模成功后继续以高脂高糖饲料喂养,按时间分为4、8、12、16周,每个时相点5只。分别选取鼠龄相同的C57BL/6J小鼠作为正常对照组,每组5只,喂养普通饲料。

1.3 Morris水迷宫实验

模型组小鼠分别于4、8、12、16周时行Morris水迷宫实验[6],检测其认知功能,并与正常组比较。

1.4 敏感硫电极测定S^{2-}

本方法为通过测定S^{2-}反映H_2S量。电极在每次使用前须在去离子水中活化2 h以上。将敏感硫电极与参比电极一起浸入到样品中,读数稳定后记录。用去离子水冲洗电极,每测一个样品结束,电极必须浸入去离子水中以保持其活化状态。每次测定前均应使用标准S^{2-}溶液用抗氧化液稀释成5、10、20、40、80 μmol/L溶液做标准曲线。

1.4.1 皮质、海马H_2S含量的测定 小鼠断头取脑,取新鲜剥离的小鼠皮质及海马各50 mg,以50 mg∶500 μL(质量分数10%)加入生理盐水制备组织匀浆,取组织匀浆500 μL加入反应瓶(10 mL锥形瓶,瓶底中央约有直径1 cm、高0.8 cm的中央孔),再加入0.5 mL 1 mol/L的HCl使组织内H_2S释放,反应瓶中央孔内加入0.5 mL 1mol/L的NaOH以吸收H_2S,迅速封口,37 ℃水浴摇床孵育4 h,取中央孔液体,加入抗氧化液后进行测定,根据标准曲线计算S^{2-}浓度。剩余组织匀浆按BCA法测定蛋白浓度(严格按照BCA试剂盒说明书进行操作),组织H_2S含量以nmol/mg蛋白表示。

1.4.2 皮质、海马内胱硫醚-β-合成酶(cystathionine-β-synthase, CBS)活性测定 小鼠皮质及海马各50 mg,用50 mmol/L磷酸缓冲液(pH 6.8)制备10%(质量分数)组织匀浆,加入反应液(0.9 mL 100 mmol/L磷酸缓冲液pH 7.4,50 μL 10 mmol/L左旋半胱氨酸,50 μL 2 mmol/L磷酸吡多醛),将其移入反应瓶,反应瓶中央孔中加1 mol/L NaOH 0.5 mL,迅速封口,反应瓶于37 ℃水浴中孵育90 min,加50%(质量分数)三氯乙酸0.5 mL,37 ℃孵育60 min终止反应,取中央孔液体用敏感硫电极法测定溶液中H_2S含量,组织匀浆行BCA蛋白定量,计算H_2S生成率,结果以nmol/(min·mg)表示。

1.5 免疫组化

取额顶叶皮层及海马石蜡包埋,连续冠状切片,按博士德SABC试剂盒说明检测皮质、海马的CBS酶表达。具体过程如下,常规石蜡脱水,酒精水化,3%过氧化氢灭活内源性酶,微波热修复后,正常山羊血清封闭,兔抗小鼠CBS一抗(1∶100)4 ℃过夜。生物素化山羊抗兔IgG 37 ℃孵育30 min,SABC试剂37 ℃孵育30 min,室温下DAB显色5~10 min,以阳性产物呈棕黄色,背景淡棕色为度。苏木精复染,盐酸酒精分化,碳酸锂返蓝。OLYMPUS-BX51正置荧光显微镜观察、照相并分析统计,计算平均光密度、数密度(目标个数/统计场面积)。

1.6 统计学处理

所有数据以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 17.0统计软件进行独立样本t检验、单因素方差分析和相关性分析。

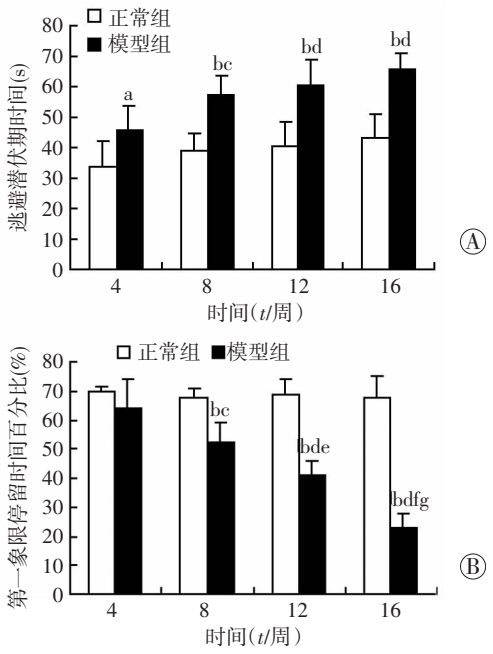
2 结果

2.1 Morris水迷宫行为学检测结果比较

2.1.1 定位航行实验结果 各组小鼠搜索并找到逃避平台的逃避潜伏期,见图1A。在测试的4 d内所有鼠的潜伏期都呈现下降趋势。正常组各时相点间潜伏期差异无统计学意义($P>0.05$)。与正常组小鼠比较,各模型组潜伏期均延长($P<0.05$),其中模型组8、12、16周较正常组延长更加明显($P<0.01$)。模型组间比较,4周分别与8、12、16周比较有差异($P<0.05$),其余模型组各时相点间差异无统计学意义($P>0.05$)。表明糖尿病小鼠发病4周时出现轻微学习能力减退,8周时出现较明显的学习记忆功能障碍。

2.1.2 空间探索实验 撤除平台后小鼠在第一象限停留时间百分比,见图1B。模型组4周在原平台所在象限停留时间百分比较正常组有减低,但无统计学意义($P>0.05$);模型组8、12、16周在该象限停留时间百分比均明显降低($P<0.01$),模

型组各时相点差异有统计学意义($P<0.05$)。结果表明,糖尿病小鼠8周开始出现明显记忆受损。



A:逃避潜伏期;B:第一象限停留时间百分比

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与正常组比较; c: $P<0.05$, d: $P<0.01$,与4周比较; e: $P<0.05$, f: $P<0.01$,与8周比较; g: $P<0.01$,与12周比较

图1 各时相点小鼠水迷宫实验结果 ($n=5$)

2.2 皮质、海马 S^{2-} 变化

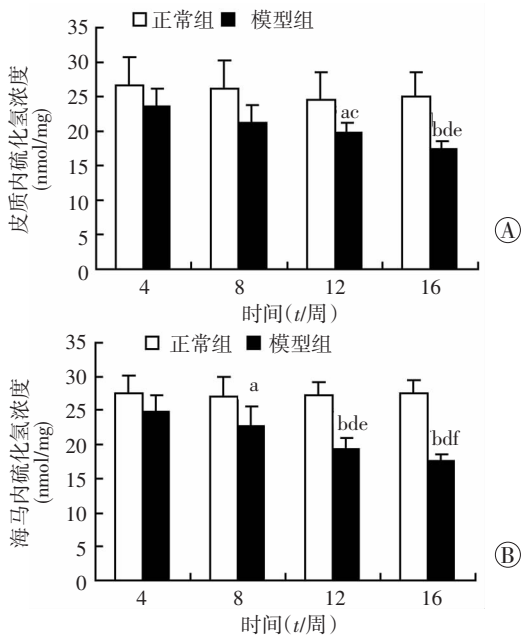
与正常组相比,模型组小鼠4周时皮质内 H_2S 含量无明显变化,8周时含量稍有减少,但差异无统计学意义($P>0.05$),12周时 H_2S 含量明显减少($P<0.05$),16周时皮质内 H_2S 含量减低更显著($P<0.01$);模型组4周与12、16周,8周与16周差异有统计学意义($P<0.05$,$P<0.01$),见图2A。与正常组相比,模型组小鼠4周时海马内 H_2S 含量无明显变化,其余各时相点 H_2S 含量减少有统计学意义($P<0.05$,$P<0.01$),其中12、16周时含量减少更加明显($P<0.01$);4周与8周,12周与16周差异无统计学意义($P>0.05$),其余时相点比较有统计学差异($P<0.05$,$P<0.01$)。见图2B。

2.3 皮质、海马内 CBS 活性变化

与正常组相比,模型组小鼠4周时皮质内CBS活性无明显变化,8周时活性稍减低,但差异无统计学意义($P>0.05$),12周时小鼠皮质内CBS酶活性明显减少($P<0.05$),16周时减低更显著($P<0.01$);模型组4周与12、16周,8周与16周差异有统计学意义($P<0.05$,$P<0.01$),见图3A。与正常组相比,模型组小鼠4周时海马内CBS活性无明显变化,其余各时相点活性降低有统计学意义($P<0.05$,$P<0.01$),其中12、16周时活性降低更加明显($P<0.01$);4周与12、16周差异有统计学意义($P<0.05$,$P<0.01$),其余模型组组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见图3B。

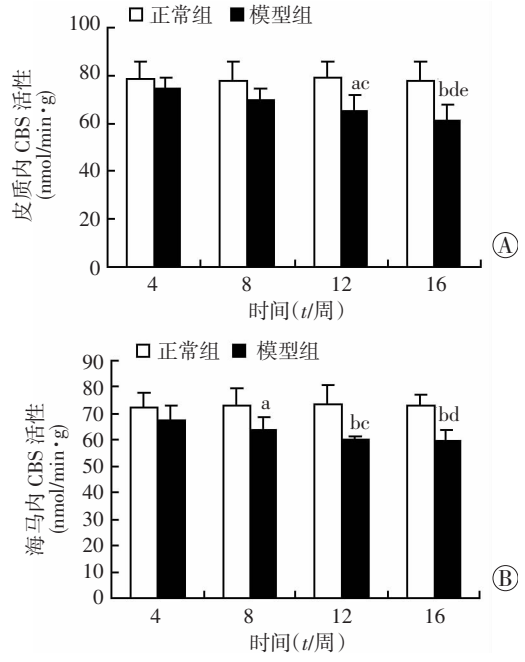
2.4 CBS 蛋白免疫组化结果

各组小鼠脑组织均可见CBS的阳性表达,阳性表达呈棕黄色颗粒,分布于小鼠大脑皮质、海马等神经元细胞的胞浆、胞膜处,尤以海马CA3区处明显。模型组8周与正常组相比,皮质中阳性表达细胞平均光密度、数密度稍减少,差异无统计学意义($P>0.05$);12周和16周减少较明显($P<0.01$),2组间比较差异无统计学意义($P>0.05$,图4,表1);在海马中,模型组8周阳性表达细胞平均光密度、数密度较对照组明显减少($P<0.05$);12、16周减少更加明显($P<0.01$),2组间比较差异无统计学意义($P>0.05$,图5,表1)。



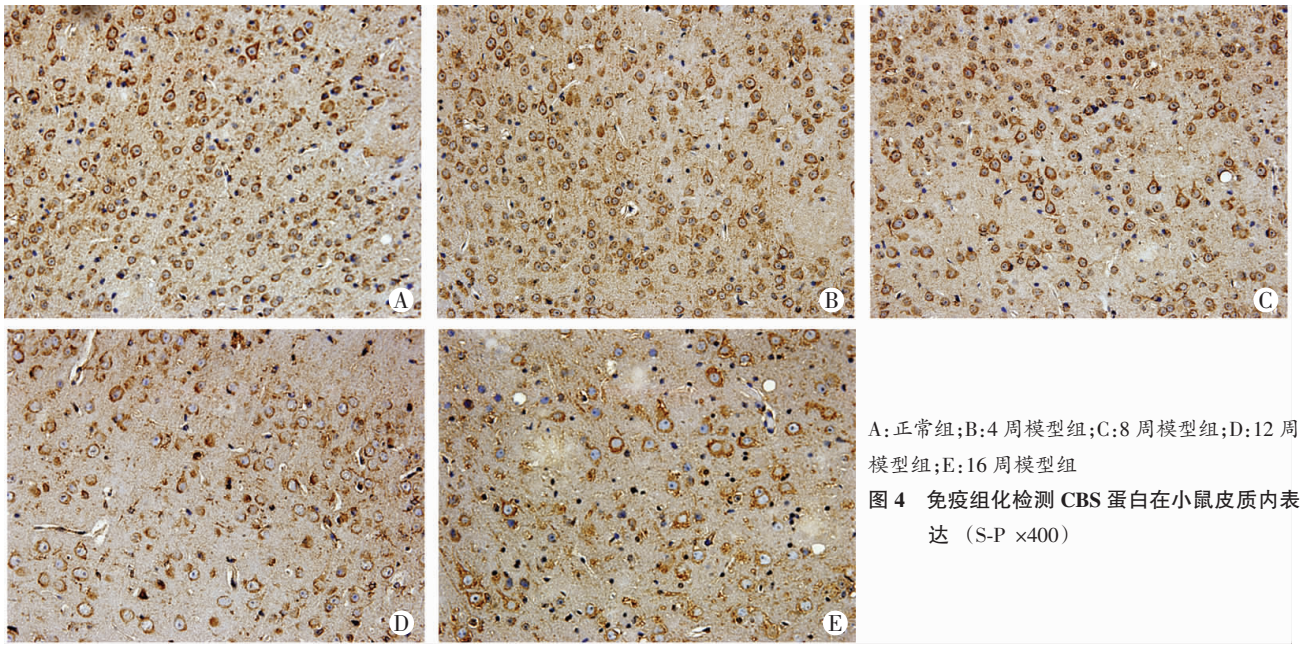
a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与正常组比较; c: $P<0.05$, d: $P<0.01$,与4周比较; e: $P<0.05$, f: $P<0.01$,与8周比较

图2 各组小鼠皮质(A)、海马(B)内 H_2S 含量变化 ($n=5$)



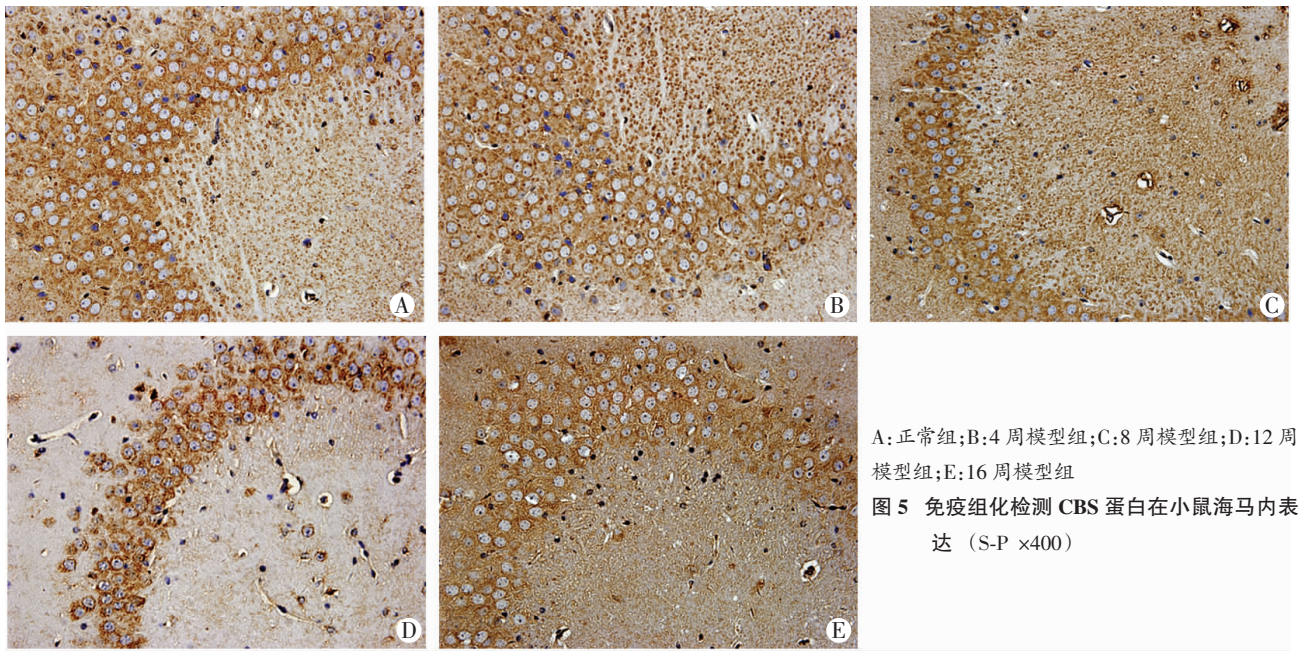
a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与正常组比较; c: $P<0.05$, d: $P<0.01$,与4周比较; e: $P<0.05$,与8周比较

图3 各组小鼠皮质(A)、海马(B)内 CBS 活性变化 ($n=5$)



A:正常组;B:4周模型组;C:8周模型组;D:12周模型组;E:16周模型组

图4 免疫组化检测CBS蛋白在小鼠皮质内表达（S-P ×400）



A:正常组;B:4周模型组;C:8周模型组;D:12周模型组;E:16周模型组

图5 免疫组化检测CBS蛋白在小鼠海马内表达（S-P ×400）

表1 各组小鼠皮质、海马内CBS蛋白表达（$n=3$, $\bar{x}\pm s$）

组别		皮质内阳性细胞数密度	海马内阳性细胞数密度	皮质内阳性细胞光密度	海马内阳性细胞光密度
正常组	4周	1.50±0.38	1.82±0.58	0.66±0.26	0.77±0.19
	8周	1.45±0.16	1.78±0.35	0.65±0.18	0.77±0.16
	12周	1.49±0.23	1.75±0.23	0.62±0.14	0.76±0.14
	16周	1.47±0.23	1.75±0.28	0.65±0.17	0.76±0.11
模型组	4周	1.48±0.29	1.63±0.27	0.63±0.17	0.74±0.24
	8周	1.22±0.23	1.36±0.12[a]	0.55±0.19	0.59±0.09[a]
	12周	0.83±0.13[bce]	0.92±0.18[bce]	0.36±0.08[bcd]	0.38±0.07[bcd]
	16周	0.74±0.15[bce]	0.87±0.24[bce]	0.33±0.08[bcd]	0.40±0.08[bcd]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与正常组比较；c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，与4周比较；e：$P<0.05$，与8周比较

2.5 相关性分析

直线相关分析结果显示敏感硫电极法测得的皮质、海马H_2S含量及CBS活性均与小鼠在第一象限停留时间百分比正相关（$r=0.958$，$r=0.956$，$r=0.967$，$r=0.907$，$P<0.01$），即脑组织内H_2S含量及促进H_2S生成的CBS活性高低与学习和记忆功能呈正相关。

3 讨论

DM和AD均属于复杂的异质性疾病，在许多方面具有共性[7]。一项在鹿特丹的临床调查显示DM人群患AD的风险较其他人高2倍[8]；美国的流行病学调查也发现T2DM与认知功能损害有关，DM患AD的比

例较非DM患者高30%～65%,认为是AD和血管性痴呆(VD)的独立危险因素[9]。长期DM可使血脑屏障的葡萄糖转运从88%降至25%并引起脑皮层血流减低,易于发生VD[10]。DM还可通过引起脂蛋白代谢异常、自由基增多、凋亡等损害神经细胞;其产生的糖基化终末产物和受体直接引起神经功能受损;高胰岛素血症及胰岛素信号转导途径异常也影响中枢神经功能[11]。

内源性H_2S作为体内的第3种气体信号分子,在体内发挥着非常重要的作用。H_2S在体内主要由CBS及胱硫醚-γ-裂解酶(CSE)催化L-半胱氨酸产生。CSE和CBS的分布具有组织特异性,在脑组织特别是海马和小脑只有CBS表达[12]。目前许多研究表明内源性H_2S可易化海马CA1区LTP的产生[1],保护神经细胞氧化性损伤[13],调节脑血管功能[14]、神经内分泌功能[15]以及神经元与胶质细胞之间的信息传递[16]。这些结果均提示H_2S与神经系统疾病有着广泛密切的联系。CBS被发现在神经系统尤其是海马中特异性表达以后,关于H_2S与神经系统疾病的研究越来越多,近年来关于H_2S与AD早期发病的研究也日趋深入。本课题组在前期也证明了AD和VD患者血清H_2S明显降低且与病情严重程度相关[4]。而在DM患者中也存在血清H_2S明显减低这一现象,并且通过建立DM大鼠模型还发现H_2S的减低可能与DM引起的血管炎症有关[17],推测DM引起的认知损害可能与H_2S的改变有关。

本实验通过长期高脂高糖饮食及腹腔注射STZ建成T2DM模型,用Morris水迷宫实验检测小鼠学习记忆能力,通过敏感硫电极法、免疫组化等方法检测脑组织内H_2S含量及CBS的变化。实验观察到T2DM建模成功4周时,DM小鼠出现轻微学习能力减退,脑组织内H_2S含量、CBS活性及蛋白表达均无明显变化;建模成功8周开始出现明显的学习记忆功能障碍,海马内H_2S含量、CBS活性及蛋白表达明显减低;建模成功12、16周时,认知功能进一步减退,皮质、海马内H_2S含量、CBS活性及蛋白表达亦进一步减少。所以我们推测,DM引发的H_2S含量减少参与了糖代谢紊乱引起的记忆认知功能的障碍过程。

目前已有DM大鼠胰腺、肝脏及肾脏内H_2S、CSE及CBE变化的相关报道[18-19]。本实验揭示了在DM小鼠脑组织中H_2S含量、CBS活性及蛋白表达减少,认知功能减退,推测内源性H_2S减少、CBS活性降低可能会引发及加重DM认知功能损害程度,但DM引发的H_2S含量减少、CBS活性及蛋白表达减少与认知功能减退的机制仍不明确,有待进一步揭示。

参考文献:

[1] Lee M, Sparatore A, Del-Soldato P, *et al*. Hydrogen sulfide-releasing NSAIDs attenuate neuroinflammation induced by microglial and astrocytic activation[J]. Glia, 2010, 58(1): 103-113.
[2] Leffler C W, Parfenova H, Jaggar J H, *et al*. Carbon monoxide and hydrogen sulfide: gaseous messengers in cerebrovascular circulation[J]. J Appl Physiol, 2006, 100(3): 1065-1076.
[3] Eto K, Asada T, Arima K, *et al*. Brain hydrogen sulfide is severely decreased in Alzheimer's disease[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 293(5): 1485-1488.
[4] 刘祥琴, 刘小琦, 蒋萍, 等. 阿尔茨海默病和血管性痴呆患者血浆硫化氢与同型半胱氨酸水平的变化及意义[J]. 中华医学杂志, 2008, 88(32): 2246-2249.
[5] Kodl C T, Seaquist E R. Cognitive dysfunction and diabetes mellitus[J]. Endocr Rev, 2008, 29(4): 494-511.
[6] 刘丽萍, 唐苏苏, 王建青, 等. 缬沙坦改善糖尿病小鼠认知损害及其机制的研究[J]. 中国药理学通报,2011, 27(3): 405-409.
[7] Moreira P I, Santos M S, Moreno A M, *et al*. Increased vulnerability of brain mitochondria in diabetic (Goto-Kakizaki) rats with aging and amyloid-beta exposure[J]. Diabetes, 2003, 52(6): 1449-1456.
[8] Reitz C, Brayne C, Mayeux R. Epidemiology of Alzheimer disease[J]. Nat Rev Neurol, 2011, 7(3): 137-152.
[9] Steen E, Terry B M, Rivera E J, *et al*. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease—is this type 3 diabetes?[J]. J Alzheimers Dis, 2005, 7(1): 63-80.
[10] Manschot S M, Brands A M, van-der-Grond J, *et al*. Brain magnetic resonance imaging correlates of impaired cognition in patients with type 2 diabetes[J]. Diabetes, 2006, 55(4): 1106-1113.
[11] Schubert M, Gautam D, Surjo D, *et al*. Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(9): 3100-3105.
[12] Robert K, Vialard F, Thiery E, *et al*. Expression of the cystathionine beta synthase (CBS) gene during mouse development and immunolocalization in adult brain[J]. J Histochem Cytochem, 2003, 51(3): 363-371.
[13] Kimura Y, Kimura H. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress[J]. FASEB J, 2004, 18(10): 1165-1167.
[14] Hu L F, Lu M, Hon-Wong P T, *et al*. Hydrogen sulfide: neurophysiology and neuropathology[J]. Antioxid Redox Signal, 2011, 15(2): 405-419.
[15] Mancuso C, Navarra P, Preziosi P. Roles of nitric oxide, carbon monoxide, and hydrogen sulfide in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis[J]. J Neurochem, 2010, 113(3): 563-575.
[16] Lee S W, Hu Y S, Hu L F, *et al*. Hydrogen sulphide regulates calcium homeostasis in microglial cells[J]. Glia, 2006, 54(2): 116-124.
[17] Jain S K, Bull R, Rains J L, *et al*. Low levels of hydrogen sulfide in the blood of diabetes patients and streptozotocin-treated rats causes vascular inflammation?[J]. Antioxid Redox Signal, 2010, 12(11): 1333-1337.
[18] Yusuf M, Kwong-Huat B T, Hsu A, *et al*. Streptozotocin-induced diabetes in the rat is associated with enhanced tissue hydrogen sulfide biosynthesis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 333(4): 1146-1152.
[19] 陈燊, 黄雯, 张红, 等. 内源性硫化氢在糖尿病肾病大鼠肾组织中表达[J]. 中国血液净化, 2010, 9(8): 433-435.

(收稿:2013-06-28;修回:2013-08-14)
(编辑 王小寒)