胰岛素与尼莫地平对大鼠基底前脑胆碱能神经元及空间学习记忆的影响

李文超[1],郭 灵[2] (1. 解放军第 303 医院门诊部;2. 广西医科大学人体解剖学教研室,广西 南宁 530021)

[摘 要] **目的** 探讨胰岛素与尼莫地平对基底前脑胆碱能神经元与学习记忆在 1 型糖尿病脑病发生中的影响。**方法** 将成年雄性 Wistar 大鼠随机分成糖尿病组、干预组、载体组及正常对照组。用链脲佐菌素成功建立成 1 型糖尿病模型 12 周后,对干预组大鼠每日皮下注射长效胰岛素(3 IU)、腹腔注射尼莫地平(20 mg/kg),连续用药 6 周,在相同条件下对载体组大鼠注射等体积的无药物液体,但对糖尿病组或正常对照组大鼠未进行任何处理。应用 Morris 水迷宫及胆碱乙酰转移酶(ChAT)免疫组化方法,分别测定各组大鼠的空间学习记忆能力及基底前脑胆碱能神经元的变化。**结果** 糖尿病组大鼠内侧隔核、斜角带核垂直支、斜角带核水平支的 ChAT 阳性神经元数均明显减少($P<0.05$),空间学习记忆能力也明显下降($P<0.05$);干预组大鼠以上三个核团的 ChAT 阳性神经元数与学习记忆能力均明显大于糖尿病组大鼠($P<0.05$),但干预组的各项指标仍然明显低于载体组大鼠或正常对照组大鼠($P<0.05$)。**结论** 在糖尿病的长期自然发展过程中,若不进行治疗则可累及到基底前脑胆碱能神经元,导致学习记忆障碍,这可能是引发 1 型糖尿病脑病的一个负性因素;此时联合应用胰岛素与尼莫地平仍可有效遏制该脑病向纵深发展的恶性势头。

[关键词] 糖尿病脑病;基底前脑;胆碱能神经元;胰岛素;尼莫地平

[中图分类号] R587.1; R-332 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2012)03-0248-04

Effects of insulin and nimodipine therapy on cholinergic neurons in the basal forebrain as well as on the learning and memory of streptozotocin-diabetic rats

LI Wen-chao, GUO Ling (Department of Outpatient, 303th Hospital of PLA, Nanning Guangxi 530021, China)

Abstract: Objective To explore the influence of insulin and nimodipine on basal forebrain cholinergic neurons and learning memory in type 1 diabetic encephalopathy. **Methods** Thirty-two male Wistar rats were randomly divided into four groups (eight rats for each group): diabetes group, intervention group, vector group and control group. Twelve weeks after establishing the model with STZ, insulin (3 IU/kg, subcutaneous injection) and nimodipine (20 mg/kg, intraperitoneal injection) were daily given to each rat in intervention group for 6 weeks consecutively while rats in the vector group were injected the same amount of liquid without drug. And rats in diabetes group and control group were out of any treatment. Morris water maze and immunohistochemistry for choline acetyltransferase (ChAT) were used to detect the change of the cognitive activities and cholinergic neurons in the basal forebrain of rats in four groups. **Results** Both the abilities of spatial learning and memory and the number of ChAT immunoreactive (ChAT-IR) neurons in MS, vDB and hDB of rats in diabetes group were the weakest or the smallest separately in the four groups ($P<0.05$). The parameters above in intervention group became significantly larger than those in diabetes group ($P<0.05$). But they were still much lower than those both in vehicle group and control group ($P<0.05$). **Conclusion** The data indicated that the obvious decreases in the number of cholinergic neurons in the basal forebrain may related to impairments in spatial learning and memory. The combined utilization of insulin and nimodipine is capable of preventing the deterioration of the encephalopathy.

Keywords: diabetic encephalopathy; basal forebrain; cholinergic neurons; insulin; nimodipine

1 型糖尿病在其发生或进展中,若累及到脑的正常结构与功能而表现出相应的临床特征,即称为 1 型糖尿病脑病(type 1 diabetic encephalopathy)[1-2]。在临床治疗学上已证实,早期单独使用胰岛素可有效干预原发病及遏制可能出现的脑病并发症[2];单独应用钙离子拮抗剂尼莫地平则可明显改善该脑病早期的认知功能障碍[3],故同时将这两个药物联合应用,将有可能成为防治 1 型糖尿病脑病的一个具有潜力的候选方案。由于基底前脑的内侧隔核(medial septum, MS)、斜角带核垂直支与斜角带核水平支(vertical and horizontal limbs of Broca diagonal band, vDB, hDB)不仅含有丰富的胆碱能神经元并与学习记忆密切相关,而且在神经退行性疾病(如 Alzheimer 病)的发生中也常受到严重损害,从而出现认知功能障碍[4-5],故基底前脑内的胆碱能神经元已成为一个易受到脑疾病攻击的目标。本研究通过建立患有 1 型糖尿病 12 周病程的大鼠模型,应用免疫组化及 Morris 水迷宫测试方法,观察在联合应用胰岛素和尼莫地平干预或者在完

[基金项目] 广西自然科学基金项目(桂科自 0542069)

[作者简介] 李文超(1960 -),男,广西梧州市人,副主任医生,本科,主要从事临床神经科学方面的研究。电话:(077)12870260, E-mail: leebij2008@163.com

[通讯作者] 郭 灵,教授,博士生导师,博士,主要从事神经内分泌学方面的研究。E-mail: drguolinggx@yahoo.com.cn

[收稿日期] 2011-12-20 [修回日期] 2012-01-16

全不用药物干预的状态下,相应模型大鼠 MS、vDB 与 hDB 的胆碱乙酰转移酶(choline acetyltransferase,ChAT,胆碱能神经元的特异性标志物)阳性神经元与学习记忆之间的相互变化关系,为合理用药配伍防治 1 型糖尿病脑病提供基础性资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂

32 只健康雄性 Wistar 大鼠,随机分成糖尿病组、干预组、载体组、正常对照组 4 组,各组均为 8 只大鼠。试剂及仪器有:链脲佐菌素(streptozotocin),尼莫地平,长效鱼精蛋白锌胰岛素,小鼠抗大鼠胆碱乙酰转移酶单克隆抗体,生物素结合山羊抗小鼠 IgG,链菌素抗生物素-过氧化物酶,二甲苯联胺(DAB),One TouchⅡ血糖检测仪,Morris 水迷宫(型号 DMS-2),中国医学科学院药物研究所产品;HM500 反制冷切片机,CHS 光学显微镜。

1.2 实验方法

1.2.1 糖尿病大鼠模型的建立 按照作者已报道的方法进行[6],即先将 Wistar 雄性大鼠禁食 24 h,然后每只大鼠按55 mg/kg 体质量作为剂量,腹腔注射刚配制成的链脲佐菌素溶液。5 d 后在大鼠尾静脉采血,用 One Touch 血糖仪测定每只大鼠空腹血糖水平,以血糖大于 16.6 mmol/L 作为标准,证明大鼠为建模成功[7]。在相同条件下,另取同批、相同数量的 Wistar 雄性大鼠,不注射链脲佐菌素,但仅腹腔注射等体积(1 mL)的柠檬酸缓冲液(pH 4.4)作为载体组。

1.2.2 干预措施 在 1 型糖尿病模型建立成功后的第 12 周,即开始对干预组的每只大鼠每日定时(上午 10 时)腹腔注射尼莫地平(20 mg/kg,溶于 2 mL 生理盐水中,pH 7.4)、皮下注射鱼精蛋白长效胰岛素 3 IU,连续注射两种药物 6 周。对于载体组的每只大鼠(在建立动物模型时已腹腔注射 1 mL 柠檬酸缓冲液,pH 4.4,时间已长达 12 周),则在相同环境及时间点腹腔注射 2 mL 生理盐水(pH 7.4)、皮下注射 0.5 mL 生理盐水(pH 7.4),通过这两种途径连续注射相应载体溶媒 6 周。对于糖尿病组和正常对照组大鼠均不进行任何处理。将以上 4 组大鼠置于完全相同环境中饲养,自由饮水和觅食。

1.2.3 Morris 水迷宫测试 按作者已报道的方法进行[6]。在各项干预完全结束后,分别用 Morris 水迷宫电脑测定系统检测各组大鼠 9 个时间段的总平均逃避潜伏期(单位:s),逃避潜伏期愈长,表示学习能力越差,反之亦然。各组大鼠在原来放置平台象限实际游泳距离占据其自己在整个游泳池里的总游泳轨迹距离的百分比(该百分比越大,表示空间记忆能力越强,反之亦然)。

1.2.4 固定与组织切片 按作者已报道的方法进行[6],所有实验动物经左心室 - 升主动脉灌注 4% 多聚甲醛溶液固定脑,继之将大鼠头部准确安置在脑立体定位仪上开颅,参照大鼠脑立体定位图谱[8],在前囟前 1.70 mm 至前囟后 -0.80 mm 的范围内切取出脑组织块,置于相同的固定液后固定 3 h,转至 30% 蔗糖溶液,待组织块下沉后行冠状连续冰冻切片,片厚 40 μm,存放于 0.01 mol/L PBS 待反应染色。

1.2.5 免疫组化反应染色 切片经 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)漂洗 3 次 ×5 min,3% H_2O_2 室温 15 min 消除大鼠脑内源性过氧化物酶催化活性;0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次 ×5 min,正常羊血清室温封闭抗原 30 min;入小鼠抗大鼠 ChAT 单克隆抗体 4 ℃过夜;0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次 ×5 min,生物素结合 IgG 室温孵育 2 h;0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次 ×5 min,链菌素抗生物素-过氧化物酶室温孵育 2 h;0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次 ×5 min,用镍-葡萄糖氧化酶(GDN)显色:成色前配制 A 液、B 液和 C 液(A 液配方:硫酸镍胺 0.4 g、D-葡萄糖 20.0 mg、氯化铵 4.0 mg;B 液配方:DAB 5.0 mg、双蒸水 5.0 mL;C 液配方:葡萄糖氧化酶 5.0 mg、双蒸水 5.0 mL)。常规脱水透明,中性树胶封片。空白对照实验均以 PBS 代替一抗,其余染色步骤均与以上完全相同。

1.2.6 细胞观察 按作者已报道的方法进行[9],参照大鼠脑立体定位图谱,针对每只大鼠选取 3 张典型断面的切片(前囟前 0.70 mm、0.48 mm、0.20 mm)作为观察对象[8]。用标准目镜方格测试系统(10 μm × 10 μm,100 μm^2)在 40 倍物镜与 10 倍目镜下对每张切片 MS、vDB 和 hDB 的背侧、腹侧、内侧及外侧 4 个视野内的阳性神经元分别进行形态观察和细胞计数(个/100 μm^2)。大鼠基底前脑三个核团各断面境界[8],在光镜下的划分方法是:经两侧前连合(ac)上缘及视神经(2n)背侧的脑腹侧沟顶端各作一条水平横线,在背侧横线上方的地域为 MS,在腹侧横线下方的区域为 hDB,在背侧、腹侧两条横线之间的地带则为 vDB。于实际计数时,将分别压在背侧横线上和腹侧横线上的阳性神经元算在 MS 内或 vDB 内(图 1)。

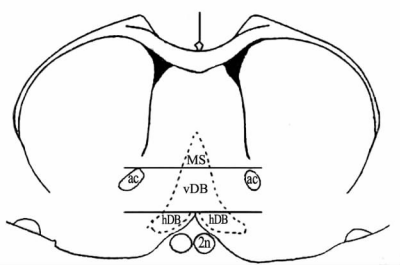


图 1 大鼠基底前脑三个核团各断面境界

1.2.7 统计分析 采用 SPSS 12.0 统计软件对原始计量资料(逃避潜伏期和 ChAT 阳性细胞数)进行处理;用秩和检验对计数资料(游泳距离百分比)进行处理与比较,,以 $P<0.05$ 判定具有统计学意义。

2 结果

2.1 Morris 水迷宫测试结果

糖尿病组大鼠的逃避潜伏期均比另外其他三组明显延长($P<0.05$),而干预组大鼠的逃避潜伏期则比糖尿病组的明显下降了 37.5%,两组之间的差异具有统计学意义($P<0.05$);但干预组大鼠的逃避潜伏期仍然分别比载体组或正常对照组大鼠上升了 30.5% 或 42.0%,三组之间的差异也均具有统计学意义($P<0.05$),但载体组与正常对照组之间的差异则无统计学意义($P>0.05$)。在游泳距离百分比方面,糖尿病组大鼠的百分比均比其他三组的明显下降($P<0.05$),而干预组大鼠的百分比几乎是糖

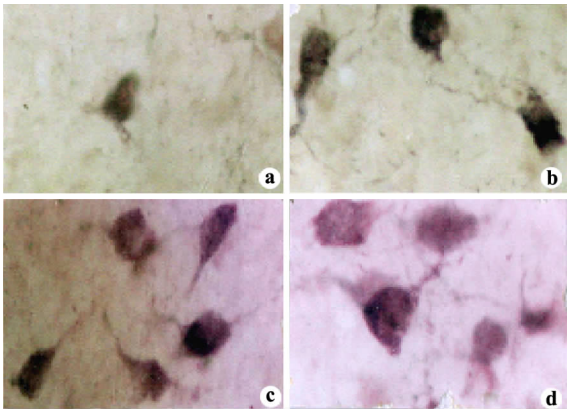
尿病组的 2 倍,两组间的差异具有统计学意义($P<0.05$);干预组的百分比依然比载体组或正常对照组的分别下降了 40.9% 或 36.1%,三组之间的差异均有统计学意义($P<0.05$),但载体组与正常对照组之间的无差异。

2.2 ChAT 阳性神经元的形态

各组大鼠 MS、vDB 与 hDB 的 ChAT 阳性神经元均被染成黑褐色,多数神经元胞体呈现圆形或卵圆形,少数为梭形;胞体常发出 13 支短树突,未见轴突被染色。比较各组大鼠相应核团的阳性神经元胞体及树突形态,均未见到明显差异(图 2 ~ 图 4)。用 PBS 替代第一抗体的空白对照反应也无颜色变化,反应结果为阴性。

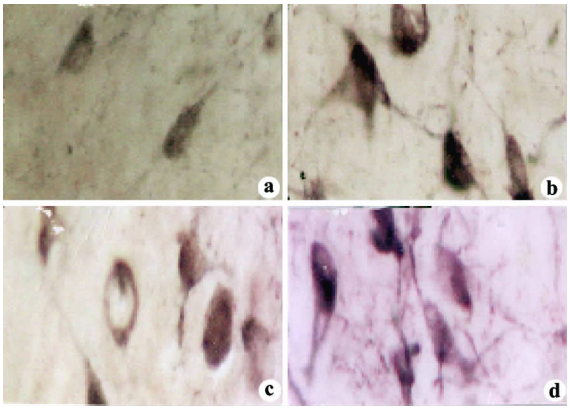
2.3 ChAT 阳性神经元数

糖尿病组大鼠 MS、vDB 及 hDB 的 ChAT 阳性神经元数均比其他三组相应核团的明显减少,组间的差异具有统计学意义($P<0.05$)。干预组大鼠 MS、vDB 及 hDB 的 ChAT 阳性神经元数分别比糖尿病组大鼠对应三个核团的提高了 69.3%、51.4% 及 50.4%,两组间的差异具有统计学意义($P<0.05$);干预组大鼠 MS、vDB 及 hDB 的 ChAT 阳性神经元数则分别比载体组三个对应核团的下降了 24.1%、25.7% 及28.8%,比正常对照组分别下降了 29.9%、28.9% 及 24.5%,各组间的差异均具有统计学意义($P<0.05$),但载体组与正常对照组 MS、vDB 及 hDB 的 ChAT 阳性神经元数之间的无差异。



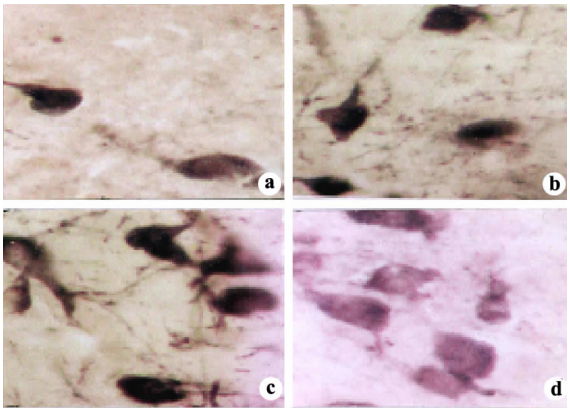
a. 糖尿病组;b. 干预组;c. 载体组;d. 正常对照组

图 2 大鼠 MS 的 ChAT 阳性神经元变化(免疫组化染色,×400)



a. 糖尿病组;b. 干预组;c. 载体组;d. 正常对照组

图 3 大鼠 vDB 的 ChAT 阳性神经元变化(免疫组化染色,×400)



a. 糖尿病组;b. 干预组;c. 载体组;d. 正常对照组

图 4 大鼠 hDB 的 ChAT 阳性神经元变化(免疫组化染色,×400)

3 讨论

本研究通过建立 1 型糖尿病大鼠模型,应用鉴定胆碱能神经元标志物的 ChAT 免疫组化及 Morris 水迷宫测试方法,观察联合应用胰岛素和尼莫地平干预前后,基底前脑胆碱能神经元与空间学习记忆之间的内在关系,所得到的实验结果显示:在大鼠已发生 1 型糖尿病 12 周病程后,若完全不用药物干预反而让其病情再自然继续发展 9 周,MS、vDB、hDB 的 ChAT 阳性神经元数与空间学习记忆能力均呈现出进行性下降的趋势;若在相同条件下联合用胰岛素与尼莫地平连续干预9 周,则可使 MS、vDB、hDB 的 ChAT 阳性神经元数与空间学习记忆能力明显提升到一定幅度,但所有这些已升高的指标仍明显低于正常水平。本研究的这些结果不仅与其他学者单独用胰岛素或单独用尼莫地平针对 1 型糖尿病模型大鼠海马、大脑皮质进行干预所观察到的结果基本一致[1-3],而且提示在 1 型糖尿病的自然消长和不断变化的过程中,若基底前脑胆碱能神经元数被明显减少到一定的阈值,即便是机体能够将尚存活的胆碱能神经元广泛动员起来,并充分发挥其代偿作用,也难以将胆碱能基底前脑原有的总体正常功能长期保持到位;一旦此种慢性超负荷的代偿功能出现失调,将可能诱发学习记忆障碍[10]。若恰在此时便立即联合应用胰岛素与尼莫地平则仍可有效阻止病变朝恶性方向发展。

有关引起基底前脑胆碱能神经元数明显减少的原因推测可能有:①用链脲佐菌素特异性破坏胰岛 β 细胞,不能合成和分泌足够量的胰岛素进入血液循环抵达脑部,致使胆碱能神经元长期缺乏胰岛素的营养支持[7];②在机体严重缺乏胰岛素的状态下,糖代谢功能发生紊乱而引起高糖血症,这将对胆碱能神经元产生负性影响[7];③患糖尿病时脑血管可发生损害,使胆碱能神经元供血不足[11];④患糖尿病时,在基底前脑所处的微环境中的钙离

子的相对稳定状态被打破[12]。在以上因素的相互积累和叠加作用下,基底前脑胆碱能神经元发生过度凋亡或者其中的 ChAT 基因表达明显下调,导致胆碱能神经元数明显下降,迫使胆碱能神经元库合成和释放的乙酰胆碱量明显低于正常水平,因而难以给予突触后的海马足够力度的正性反馈支撑,最终诱发空间学习记忆障碍。

本研究针对上述可能涉及到的负性因素而采取联合用药,以阻断该脑病发生机制的一些环节,并获得一定的防治效果。例如使用胰岛素解决了体内紧缺该激素的根本问题,既可直接营养胆碱能神经元,又可降低过高的血糖而有效保护胆碱能神经元免受损害;而应用尼莫地平则可保护脑血管免受损伤,解除基底前脑供血不良的困境,尼莫地平还可阻止细胞外液中的钙离子进入神经元胞浆内,从而避免发生过度神经元凋亡,并提高学习记忆能力[11-12]。由此可见,本研究联合应用胰岛素和尼莫地平来干预该脑病,体现出这两个药物在作用上具有较好的兼容性和互补性,故初步达到了病因治疗和防治并发症的双重目标。

然而,由于本研究所建立的 1 型糖尿病模型大鼠的患病时限较长(12 周),这可能对基底前脑胆碱能神经元危害的程度也相对大,加上成年大鼠的该脑区已完全缺乏具有增殖和自我更新能力的神经干细胞[9-11],因而在终极分化、已完全丧失了增殖功能的胆碱能神经元损害后,即使是在其邻近有同类的正常神经元也无能力挽救这种损失,使得胆碱能神经元数减少似乎成为一种不可逆的演变趋势,由此也可能在结构和功能方面留下一些后遗症。在这种不良的前提下,即使立即联合使用胰岛素和尼莫地平治疗,也难以将所有病变彻底消除并恢复到原来的正常状态,这或许是本研究联合用药不能将已发生了明显下降的胆碱能神经元数与明显下降的空间学习记忆能力完全提升到正常水平的一个原因,同时也提示临床治疗时尽快明确诊断和早期用药的重要性。此外,本研究的各组大鼠基底前脑胆碱能神经元的形态均无明显差异,这可能与 1 型糖尿病不明显影响到胆碱能神经元胞浆内细胞骨架的组装和配布有关,所有这些也还需深入研究来证实。

[参考文献]

[1] Li ZG, Zhang W, Sima AA. Alzheimer-like changes in rat models of spontaneous diabetes[J]. Diabetes, 2007, 56(7): 1817 – 1824.

[2] Francis GJ, Martinez JA, Liu WQ, et al. Intranasal insulin prevents cognitive decline, cerebral atrophy and white matter changes in murine type 1 diabetic encephalopathy[J]. Brain, 2008, 131(pt 12): 3311 – 3334.

[3] Biessels GJ, ter Lauk MP, Kamal A, et al. Effects of the Ca^{2+} antagonist nimodipine on functional deficits in the peripheral and central nervous system of streptozotocin-diabetic rats[J]. Brain Res, 2005, 1035(1): 86 – 93.

[4] Sofroniew MV, Pearson RC, Powell TP. The cholinergic nuclei of the basal forebrain of the rat: normal structure, development and experimentally induced degeneration[J]. Brain Res, 1987, 411(2): 310 – 331.

[5] 周丽华,姚志彬,陈以慈,等. 基底前脑解剖学及其临床意义[J]. 神经解剖学杂志, 1998, 14(4): 401 – 405.

[6] 郭 灵,崔卫刚,蓝 玲,等. 1 型糖尿病脑病大鼠空间学习记忆与海马齿状回神经干细胞增殖的观察[J]. 解剖学研究, 2009, 31(2): 99 – 102.

[7] 张栋珉,肖 谦. 糖尿病大鼠海马胆碱乙酰转移酶表达与认知功能的相关性[J]. 第四军医大学学报, 2009, 30(22): 2553 – 2556.

[8] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates[M]. 3rd ed. San Diego: Academic Press Inc, 1997.

[9] 郭 灵,谢 瑶,汪华侨,等. 剥夺卵巢雌激素对成年大鼠基底前脑神经元表达 Nestin 的影响[J]. 解剖科学进展, 2001, 7(4): 299 – 302.

[10] 王洪荣,王 薇,郭 灵,等. 褪黑色素对 1 型糖尿病脑病大鼠学习记忆和海马齿状回细胞调亡及 Bax 与 Bcl-2 蛋白表达的影响[J]. 解剖学研究, 2009, 31(2): 94 – 48.

[11] 代小思,康 健,万芮涵,等. 四氧嘧啶诱导 1 型糖尿病动物模型的建立[J]. 局解手术学杂志, 2011, 20(1): 20 – 21.

[12] 张 为,覃少东,吕泽平,等. 尼莫地平对糖尿病认知功能障碍的临床研究[J]. 医学综述, 2008, 14(16): 2539 – 2541.

(编辑:左艳芳)

(上接第 247 页)

[参考文献]

[1] 陈 霞,彭 雨,李 笛,等. 双上肢双肱动脉变异 1 例[J]. 局解手术学杂志, 2006, 15(5): 291.

[2] 刘永寿,侯金林,王淑玲,等. 臂部动脉干的双干型变异造影视察[J]. 北京医科大学学报, 1997, 29(2): 157 – 159.

[3] Enneking WF, Spanier SS, Goodman MA. A system for the surgical staging of musculoskeletal sarcoma[J]. Clinical Orthopaedics Related Research, 1980, 153(1): 106 – 120.

[4] 闫丽凤. 硬化性上皮样纤维肉瘤 2 例病理特点分析[J]. 中国误诊学杂志, 2011, 11(10): 2501.

[5] 贺晓燕,杨 勇,刘庆荣. 复发的误诊为纤维瘤的高分化脂肪肉瘤 1 例报道[J]. 罕少疾病杂志, 2010, 17(2): 58 – 59.

[6] 邓道钧. 上臂动脉干的变异-臂浅动脉的类型[J]. 解剖学报, 1963, 6(4): 362 – 371.

[7] 邓道钧. 国人上臂动脉干的变异、分型及其定名的商榷[J]. 医学研究杂志, 1983, (2): 89 – 91.

[8] 俞寿民,郑观德,韩永坚. 臂及前臂动脉主干的变异[J]. 解剖学报, 1962, 5(Z1): 391 – 392.

[9] 陈尔瑜,张素贞,沈吾龙. 臂和前臂的动脉的观察[J]. 解剖学报, 1965, 8(1): 29.

[10] 张业辉,李少华,徐达传. 拇、示指动脉的分型及其临床意义[J]. 中国临床解剖学杂志, 2008, 26(4): 383 – 385.

[11] 卢钦炳,陈海芳. 掌浅弓变异一例[J]. 解剖学研究, 2010, 32(3): 177.

(编辑:何泓睿)