基础研究 文章编号:0253-3626(2010)07-0978-03

血管紧张素Ⅳ对糖尿病大鼠海马神经元凋亡及其认知功能的影响

张栋珉,肖 谦,张 颖
(重庆医科大学附属第一医院老年科内分泌组,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察血管紧张素Ⅳ(Angiotensin Ⅳ,AngⅣ)对糖尿病大鼠海马神经元凋亡及其认知功能的影响。方法:38 只 SD 大鼠随机分为正常对照组、糖尿病组和糖尿病 +AngⅣ组,建立 STZ 糖尿病大鼠模型,Morris 水迷宫测试大鼠学习和记忆能力,免疫组化观察大鼠海马凋亡调节因子 Bcl-xl 的表达,同时用原位末端标记法检测海马神经元凋亡。结果:糖尿病 + AngⅣ组大鼠学习和记忆成绩明显优于糖尿病组($P<0.05$),其海马 Bcl-xl 表达也明显增高($P<0.05$),而且其海马神经元凋亡明显减少。结论:AngⅣ对糖尿病大鼠认知功能有改善作用,机制可能与上调 Bcl-xl 的表达保护海马神经元凋亡有关。

【关键词】血管紧张素Ⅳ;糖尿病;凋亡;认知功能
【中国图书分类法分类号】R587.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-11-04

Effects of angiotensin Ⅳ on the hippocampus neuronal apoptosis and the cognitive function of diabetic rats

ZHANG Dong-ming, et al
(*Group of Endocrinology, Department of Geriatrics, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the effects of angiotensin Ⅳ on the hippocampus neuronal apoptosis and the cognitive function of diabetic rats. *Methods*: 38 SD male rats were divided into normal group, diabetic model group and angiotensin Ⅳ treatment group randomly. Streptozotocin-diabetic rat model was established and learning and memory behaviors were investigated using a spatial version of the Morris water maze test. The expression of Bcl-xl of all rats was examined with immunohistochemical method. Meanwhile, the hippocampal neuronal apoptosis were measured by TUNEL. *Results*: Learning and memory grade in the angiotensin Ⅳ treatment group were better than diabetic model group ($P<0.05$). The changes of Bcl-xl in hippocampus significantly increased in the angiotensin Ⅳ treatment group and the number of apoptotic neurons of the hippocampus was decreased remarkably ($P<0.05$). *Conclusion*: Angiotensin Ⅳ could improve cognitive ability in diabetic rats by increasing the expression of Bcl-xl to protect hippocampus neuronal apoptosis.

【Key words】Angiotensin Ⅳ; Diabetes mellitus; Apoptosis; Cognition

糖尿病中枢神经系统并发症正日益引起学术界的重视,越来越多的证据表明糖尿病患者伴有轻、中度的认知功能损害,而且这些患者发生痴呆和阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的风险远高于正常人群[1,2]。因此,探索糖尿病脑病的发病机制有重要的临床意义。研究证实神经元凋亡广泛存在于 AD、帕金森氏病和亨廷顿病等常见认知功能疾病,提示神经元凋亡与认知功能关系密切[3]。本实验采用 1 型糖尿病模型,研究侧脑室注射 AngⅣ(Angiotensin Ⅳ, AngⅣ)对糖尿病大鼠认知功能和海马神经元凋亡以及凋亡调控因子 Bcl-xl 表达的影响,探索糖尿病脑病的发病机制。

作者介绍:张栋珉(1979-),男,硕士,
研究方向:糖尿病及其慢性并发症。
通讯作者:肖 谦,男,教授,E-mail:xiaoqian1956@126.com。
基金项目:重庆市卫生局医学科研项目(编号:2008-2-79)。

1 材料与方法

1.1 材料

链脲佐菌素(Streptozotocin, STZ,美国 Alexis 公司);血糖仪(德国罗氏);大鼠脑立体定位仪(美国 stoelting 公司);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);AngⅣ(购自美国凤凰药业有限公司);兔抗大鼠 Bcl-xl 多克隆抗体(购自武汉博士德公司);TUNEL 检测试剂盒(购自罗氏公司)。

1.2 动物

SD(Sprague-Dawley)雄性大鼠 38 只,8 ~ 10 周龄,体重 180 ~ 220 g,购自重庆医科大学动物实验中心。动物适应喂养 1 周后,随机分为正常对照组 10 只、糖尿病组 14 只和糖尿病 +AngⅣ组 14 只。建立 STZ 糖尿病模型,大鼠禁食 12 h,糖尿病组和糖尿病 +AngⅣ组按 60 mg/kg 剂量腹腔一次性注射

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。血糖稳定 3 d 后，尾静脉取血测随机血糖：正常组 10 只大鼠血糖为（4.5 ± 0.3）mmol/L，糖尿病组和糖尿病 +AngⅣ组所有大鼠血糖均＞16.67 mmol/L，糖尿病模型建立成功。成模后第 11 周，各组均进行水迷宫测试，然后糖尿病 +AngⅣ组侧脑室每天注射 AngⅣ 5 nmol（1 nmol/μl），糖尿病组和正常对照组注射等体积的生理盐水，持续一周，所有实验大鼠再次进行水迷宫测试。

1.3 Morris 水迷宫测试

Morris 水迷宫操作系统，包括直径 150 cm 的圆形水池，高 15 cm、直径 10 cm 的平台，平台表面低于水面 2 cm，水迷宫记录分析系统。成模后第 11 周，训练 3 d，第 4 d 进行隐藏平台获得实验，分析潜伏期，考察学习能力。第 5 d 撤去平台进行空间搜索实验——去除平台观察 2 min 内大鼠在中心区域停留时间百分比，测试记忆能力。干预一周再次重复上述实验。

1.4 侧脑室注射

成模后第 11 周，各组大鼠水迷宫测试完毕即行侧脑室注射。大鼠经 4%水合氯醛（10 ml/kg）腹腔注射麻醉后，固定于脑立体定位仪，沿颅顶正中线剪开头皮暴露颅骨，大鼠侧脑室穿刺坐标[4]：前囟后 1.0 mm，右 1.5 mm，深 3.5 mm。微型电钻沿此穿刺点钻孔。将带内芯的不锈钢套管（外径 0.9 mm，内径 0.5 mm）垂直插入侧脑室内，牙托粉粘合固定套管，凝固后缝合伤口。术后大鼠分笼饲养并予青霉素抗炎。导管置入后第 4 d 开始进行侧脑室注射，消毒导管表面，拔出内芯，生理盐水将 AngⅣ配成所需浓度（1 nmol/μl），微量注射器 3 min 内将 5μl AngⅣ溶液匀速注入侧脑室，留针 1 min，每天给药 1 次。正常对照组和糖尿病组注射等体积生理盐水，持续 7 d。

1.5 免疫组化

采用 SP 法免疫组织化学染色。处死大鼠，1%多聚甲醛心脏灌注取脑，石蜡包埋连续冠状切片，根据试剂盒说明检测 Bcl-xl 在各组大鼠海马的表达。具体步骤如下：切片常规脱蜡至水，微波热修复抗原，3%过氧化氢灭活内源性酶，正常山羊血清封闭，滴加一抗 4℃过夜，切片 37℃孵育 1 h，顺序滴加生物素化山羊抗兔 IgG、辣根过氧化物酶，DAB 显色，镜下控制反应时间，以阳性产物为棕黄色为度，苏木素复染，脱水透明中性树脂封片，显微镜观察照相。每只标本随机取 1 张切片，每张切片高倍镜（×400）下随机选择 3 个视野的海马区域，采用 Image-Pro Plus6.0 软件测定该区域 Bcl-xl 阳性染色神经元的平均吸光度值，取其平均吸光度值作为结果。

1.6 原位末端标记法（TUNEL）

大鼠按前述方法制成石蜡切片，常规脱蜡至水，严格按试剂盒说明书操作。光镜下凋亡细胞呈棕黄色，高倍镜下随机观察 5 个视野（不同切片），计数海马凋亡细胞数。

1.7 统计学处理

所有实验数据用（$\bar{x} \pm s$）表示，采用 SPSS10.0 统计分析软件进行 ANOVA 分析，并做组间两两比较。

2 结 果

2.1 Morris 水迷宫测试结果

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

2.1.2 空间搜索实验 糖尿病组与正常对照组相比，中心区域停留时间百分比明显下降（$P<0.05$）。上述参数，糖尿病 +AngⅣ组较糖尿病组明显增加（$P<0.05$），与正常对照组比较无明显差异（$P>0.05$）。见图 2。

2.2 免疫组化结果（图 3）

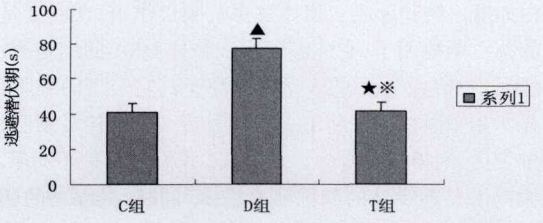
正常组大鼠海马区可见神经元胞浆有棕黄色的 Bcl-xl 阳性着染。图像分析结果显示，糖尿病组 Bcl-xl 表达明显降低（平均吸光度值 0.22 ± 0.02，与正常对照组相比，$P<0.05$）。糖尿病 +AngⅣ组与糖尿病组比较，Bcl-xl 表达明显增加（平均吸光度值 0.25 ± 0.01，$P<0.05$），但与正常对照组比较无明显差异（$P>0.05$）。

2.3 大鼠海马神经元凋亡（图 4）

TUNEL 阳性细胞核染色呈棕黄色，核固缩呈不规则形或圆形，高倍镜下可见染色质深染聚集成块或碎裂、核边集。正常组大鼠凋亡细胞较少，糖尿病组大鼠海马凋亡细胞显著增多（82.56 ± 17.04，与正常组相比，$P<0.05$）。糖尿病 +AngⅣ组大鼠海马凋亡细胞明显减少（24.60 ± 3.25，与糖尿病组相比，$P<0.05$）。

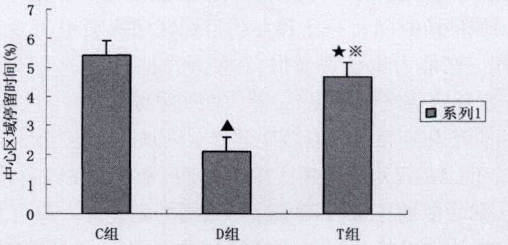
3 讨 论

肾素－血管紧张素系统（Renin-angiotensin system，RAS）是人体内重要的内分泌系统之一，以往对于 RAS 的研究多集中在 AngⅡ。AngⅣ是 RAS 家族的新成员，它是 AngⅡ C 末



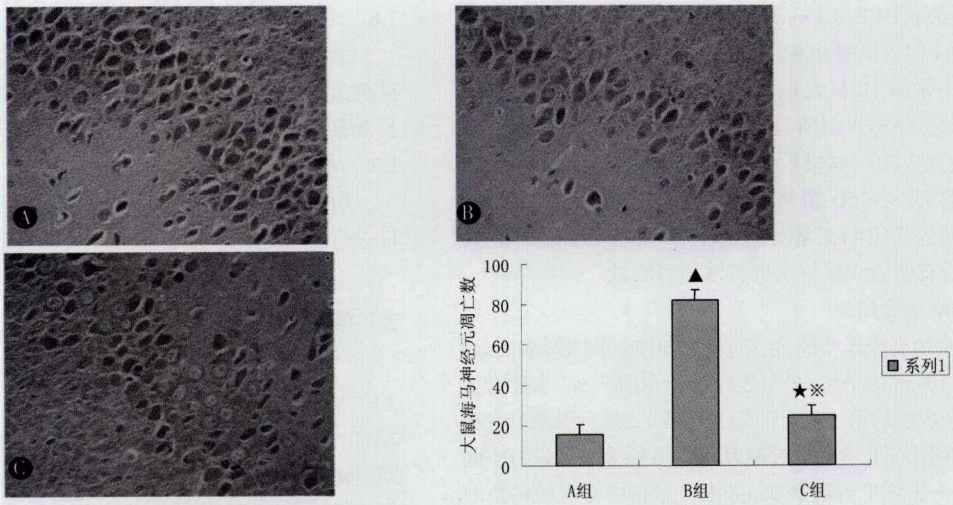
▲与 C 组比较，$P<0.05$；★与 C 组比较，$P>0.05$；※与 D 组比较，$P<0.05$；C 组. 正常对照组；D 组. 糖尿病组；T 组. 糖尿病 +AngⅣ组

图 1 隐藏平台获得实验结果



▲与 C 组比较，$P<0.05$；★与 C 组比较，$P>0.05$；※与 D 组比较，$P<0.05$；C 组. 正常对照组；D 组. 糖尿病组；T 组. 糖尿病 +AngⅣ组

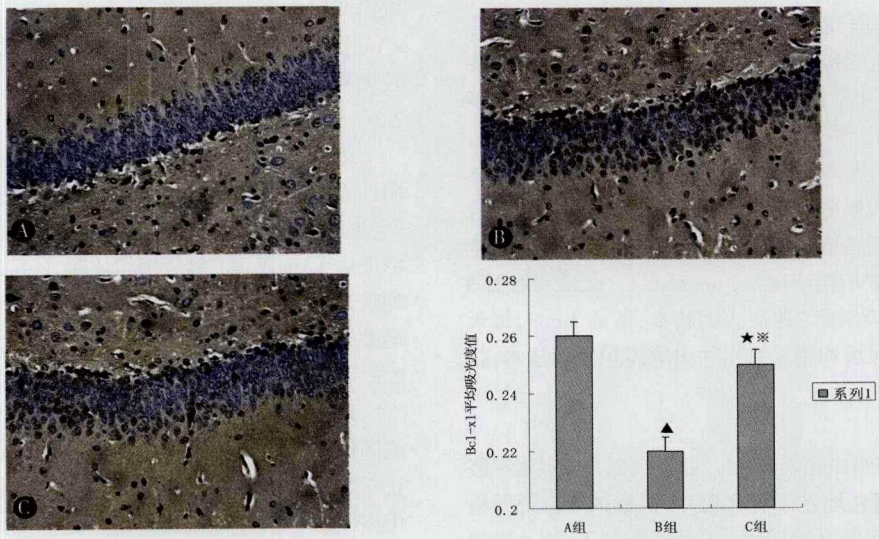
图 2 空间搜索实验结果



▲与 A 组比较，$P<0.05$；★与 A 组比较，$P>0.05$；※与 B 组比较，$P<0.05$

A 组. 正常组；B 组. 糖尿病组；C 组. 糖尿病 +AngⅣ组

图 3　免疫组化方法检测各组大鼠海马 CA1 区 Bcl-xl 的表达（SP×400）



▲与 A 组比较，$P<0.05$；★与 A 组比较，$P>0.05$；※与 B 组比较，$P<0.05$

A 组. 正常组；B 组. 糖尿病组；C 组. 糖尿病 +AngⅣ组

图 4　TUNEL 法检测各组大鼠海马 CA1 区神经元凋亡（×400）

端的 6 肽片段，由 AngⅡ在氨基肽酶 B 的作用下裂解而成，AngⅣ在体内有其特异性的高亲和力受体 AT4。近年来有系列研究发现，AngⅣ对认知功能有着重要的影响[5-9]。

我们的实验发现，糖尿病组大鼠在成模 11 周的行为学测试中就表现出明显的认知功能损害：其 Morris 水迷宫测试潜伏期明显延长，表明此时糖尿病大鼠已经出现学习能力减退；中心区域停留时间百分比和穿越目标区域次数也明显减少，显示其记忆能力也显著受损，在使用 AngⅣ进行干预后，其 Morris 水迷宫成绩明显提高，潜伏期明显缩短，中心区域停留时间百分比和穿越目标区域次数显著增加，甚至接近于正常大鼠，表明 AngⅣ对糖尿病认知功能障碍有明显的改善作用。

认知功能的正常有赖于海马结构的完整性。研究显示，导致 AD 认知功能损害的主要原因之一就是海马的神经元变性，而且这种表现在海马的 CA1 区尤为显著[10]。我们的实验发现，在水迷宫测试中表现出明显认知功能障碍的糖尿病大鼠，其海马 CA1 区的神经元凋亡也显著增加，提示神经元凋亡也参与了糖尿病脑病的发病过程。研究表明细胞的凋亡过程要受到一系列相关基因的调节和控制，Bcl-2 基因家族就是其重要的成员。Bcl-2 家族既包括促凋亡基因，也包括抑制凋亡的基因。Bcl-xl 是 Bcl-2 家族中新近发现的具有抑制凋亡作用的蛋白，它位于线粒体膜的两侧，通过与促进凋亡的蛋白如 Bax 结和形成二聚体发挥抗凋亡作用。Bcl-2 是最常见的凋亡调控因子，它能够阻止线粒体 DNA 的细胞凋亡。而神经元中 Bcl-2 基因的表达明显高于其它类型的细胞，有研究显示用微量注射法将 Bcl-2 基因转入交感神经细胞，使之过量表达，则神经元寿命显著延长。我们的实验还发现，糖尿病大鼠海马神经元的凋亡显著增多，同时，其海马的凋亡调节因子 Bcl-xl 的表达水平却明显下降；进一步提示糖尿病脑病的发生可能是因为其海马抑制凋亡的调节因子 Bcl-xl 含量减少，对凋亡的抑制减弱导致海马神经元凋亡增多，从

基础研究 文章编号:0253-3626(2010)07-0981-04

甲基化抑制剂 5- 氮杂胞苷对 HL-60 细胞增殖及凋亡的影响

苏庸春,徐酉华,蔡 倩,胡艳妮,李 欣,罗 庆
(重庆医科大学附属儿童医院血液肿瘤科,重庆 400014)

【摘 要】目的:观察 5- 氮杂胞苷对髓系白血病细胞系 HL-60 的增殖抑制作用,探讨其对细胞周期、细胞凋亡的影响。方法:常规方法培养 HL-60 细胞,加入不同浓度的 5- 氮杂胞苷,以 MTT 法测定对 HL-60 的抑制作用,计算细胞生长抑制率;流式细胞术检测小剂量 5- 氮杂胞苷处理 HL-60 细胞后 48 h 的细胞凋亡率及细胞周期分布特点。结果:不同浓度 5- 氮杂胞苷均可以不同程度的抑制细胞生长,且表现为时间、浓度依赖性。在小剂量浓度 5- 氮杂胞苷处理 HL-60 细胞 48 h 后,随着 5- 氮杂胞苷浓度的增加,凋亡细胞百分比逐渐增多($P<0.05$);G_1 期细胞逐渐增多,S 期细胞减少,G_2/M 期细胞相对增多,细胞阻滞在 G_1 期。结论:5- 氮杂胞苷对髓系白细胞细胞系 HL-60 的生长抑制表现为浓度和时间依赖性,一定剂量的 5- 氮杂胞苷诱导细胞凋亡,使细胞阻滞在 G_1 期。

【关键词】基因甲基化;5- 氮杂胞苷;白血病;凋亡;细胞周期
【中国图书分类法分类号】R733.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-09-10

5-Aza-cytidine inhibit proliferation of human promyelocytic leukemia cells (HL60) by inducing apoptosis

SU Yong-chun, et al
(*Department of Hematology/Oncology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objevtive*: This study was aimed to investigate the effect of 5-aza-cytidine on the proliferation, cell cycles distribution profile and apoptosis of human promyelocytic cell line HL60. *Methods*: The human promyelocytic cell line HL-60 was cultured in RPMI 1640 medium. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenylte trazolium (MTT) reduction by cells was used to assess drug-induced cell growth inhibition. Cells were treated with 0.25,

作者介绍:苏庸春(1971-),男,副教授/副主任医师,博士,研究方向:血液肿瘤性疾病临床与基础。
通讯作者:徐酉华,女,教授,E-mail: xuyouhua0504@163.com。
基金项目:重庆市卫生局科研基金资助项目(编号:渝卫科教 34 号 06-2-193)。

而导致认知功能的损害。

关于 AngⅣ改善糖尿病大鼠认知功能的机制目前仍不清楚,推测可能与其易化海马的长时程增强(Long-term potentiation,LTP)效应、刺激一氧化氮的合成和分泌,增加中枢血流改善脑灌注、增加海马胆碱乙酰转移酶表达水平,促进乙酰胆碱的合成有关。我们的实验证实,AngⅣ干预组的糖尿病大鼠在认知功能改善的同时,其海马神经元凋亡明显减少,而且 Bcl-xl 表达水平明显上升,因此我们认为,AngⅣ上调海马 Bcl-xl 表达,从而减少海马神经元凋亡,可能是其改善糖尿病大鼠观察认知功能的又一重要途径。

参 考 文 献

[1] Brismar T, Maurex L, Cooray G, et al. Predictors of cognitive impairment in type 1 diabetes[J]. Psychoneuroendocrinology, 2007, 32(8):1041-1051.
[2] Northam E A, Rankins D, Cameron F J. Therapy insight: the impact of type 1 diabetes on brain development and function[J]. Nat Clin Pract Neurol, 2006, 2:78-86.
[3] L. Stefanis, R.E. Burke, L.A. Greene. Apoptosis in neurodegenerative disorders[J]. Curr Opin Neurol, 1997, 10(4):299-305.
[4] 包新民,舒斯云.大鼠脑立体定向图谱[M].北京:人民卫生出版社,1991.12-18.
[5] Tchekalarova J, Kambourova T, Georgiev V. Interaction between angiotensin IV and adenosine A(1) receptor related drugs in passive avoidance conditioning in rats[J]. Behav Brain Res, 2001, 123(1):113-116.
[6] Albiston A L, Pederson E S, Burns P, et al. Attenuation of scopolamine-induced learning deficits by LVV-hemorphin-7 in rats in the passive avoidance and water maze paradigms[J]. Behav Brain Res, 2004, 154(1):239-243.
[7] Olson M L, Olson E A, Qualls J H, et al. Norleucine1-Angiotensin IV alleviates mecamylamine-induced spatial memory deficits[J]. Peptides, 2004, 25(2):233-241.
[8] Wiśniewski K, Borawska M, Car H. The effect of angiotensin Ⅱ and its fragments on post-alcohol impairment of learning and memory[J]. Pol Pharmacol, 1993, 45(1):23-29.
[9] Wright J W, Clemens J A, Panetta J A, et al. Effects of LY231617 and angiotensin Ⅳ on ischemia-induced deficits in circular water maze and passive avoidance performance in rats[J]. Brain Res, 1996, 717(1-2):1-11.
[10] Miller D B, O'Callaghan J P. Aging, stress and the hippocampus[J]. Ageing Res Rev, 2005, 4(2):123-140.

(责任编辑:关蕴良)