维普资讯 http://www.cqvip.com

论著 文章编号:0253-3626(2007)03-0257-04

尼莫地平对糖尿病大鼠海马突触素蛋白和 mRNA 表达的影响

高 原,肖 谦,赵柯湘,高爱滨,吴绮楠

(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:观察尼莫地平对糖尿病大鼠海马突触素表达的影响。方法:将 38 只 Wistar 大鼠随机分为正常对照组、糖尿病组、糖尿病 + 尼莫地平组。建立 STZ 糖尿病大鼠模型,尼莫地平干预 12 周,Morris 水迷宫测试其学习记忆能力,免疫组化观察大鼠海马突触素蛋白表达,RT-PCR 检测突触素 mRNA 水平表达变化。结果:尼莫地平组与糖尿病组比较,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($P<0.05$),突触素蛋白和 mRNA 表达均增加($P<0.05$)。结论:尼莫地平对糖尿病大鼠认知功能的保护作用可能与其使海马突触素表达增加有关。

【关键词】尼莫地平;糖尿病;认知功能;突触素

【中国图书分类法分类号】R587.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-12-18

Effect of Nimodipine on the expression of synaptic protein and mRNA in diabetic rat hippocampus

GAO Yuan, et al

(*Endocrinology group, Department of Geriatrics, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the effect of Nimodipine on synaptophysin in diabetic rat. *Methods*: 38 Wistar rats were divided into the normal control group, diabetic model group, the Nimodipine treatment group randomly. Streptozotocin-diabetic rat model was established. The diabetic rats were treated with Nimodipine for 12 weeks. Then, the learning and memory abilities of rats were tested with the Morris water maze. The mRNA and protein level of synaptophysin in hippocampus were detected by RT-PCR and immunohistochemical method. *Results*: Compared with diabetic model group, the Nimodipine treatment group showed a significant decrease in the mean time of escape latencies ($P<0.05$) and a increase in percentage of stay time in the the central area and the number of passing the original platform position ($P<0.05$). And the expression of synaptic protein and mRNA in hippocampus were elevated significantly ($P<0.05$). *Conclusion*: It is concluded that Nimodipine could improve cognitive ability in diabetic rat through increasing the expression of synaptophysin.

【Key words】Nimodipine; Diabetes; Cognition; Synaptophysin

糖尿病已成为继心血管疾病和肿瘤之后的第三大非传染性疾病,其各种慢性并发症是糖尿病患者致死致残的主要原因。以往对糖尿病肾脏、心脏、眼、外周神经并发症研究较多,而对糖尿病中枢神经系统损害导致的糖尿病脑病 (Diabetic encephalopathy)研究甚少,目前糖尿病脑病作为糖尿病独立的一个慢性并发症已被医学界公认,正逐渐成为基础和临床相关学科的研究热点[1]。糖尿病脑病与痴呆都存在认知功能改变。国外已有多项流行病学资料显示糖尿病和痴呆密切相关,糖尿病已成为痴呆的危险因素[1]。美国神经学会《痴呆治疗指南》中推荐尼莫地平(Nimodipine)用于改善痴呆病人记忆力缺陷,提高混合性痴呆患者的总体功能。本研究将尼莫地平应用于糖尿病动物模型,比较尼莫地平干预后糖尿病大鼠行为学和海马突触素(synaptophysin, SYP)表达的改变,期望从形态学、分子生物学以及行为学方面观察尼莫地平对糖尿病大鼠认知功能的保护作用。

作者介绍:高 原(1975-),女,住院医师,硕士生,主要研究方向:糖尿病慢性并发症。

1 材料与方法

1.1 材料

链脲佐菌素 STZ (streptozotocin-induced diabetic rats, STZ)(美国 Alexis 公司);LifeScan 血糖仪(美国强生);Morris

维普资讯 http://www.cqvip.com

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);尼莫地平(德国 Bayer 公司,商品名:尼莫同);小鼠抗大鼠突触素单克隆抗体 (克隆号 SVP-38, 武汉博士德);RT-PCR 试剂盒(宝生物工程大连有限公司);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 动物

成年 Wistar 雄性大鼠 38 只,体重 180~200g,8~10 周龄,采用 STZ 糖尿病模型。大鼠禁食 12h,糖尿病组和尼莫地平组按 65mg/kg 剂量腹腔一次注射 1%STZ(溶于 pH4.2,0.1mol/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 天后,血糖 >16.67mmol/L 糖尿病模型制作成功。糖尿病成模大鼠 28 只, 随机分为 2 组:糖尿病组和尼莫地平组各 14 只,设置正常对照组 10 只。成模同时尼莫地平组给予尼莫地平灌胃 20mg/(kg.d),干预 12 周;正常对照组和糖尿病组同期给予等量生理盐水灌胃。实验终点糖尿病组死亡 5 只,尼莫地平组死亡 2 只。

1.3 Morris 水迷宫(Morris water maze)测试

Morris 水迷宫操作系统,包括直径 150cm 的圆形水池,直径 10cm、高 15cm 的平台,平台表面低于水面 2cm,水迷宫记录分析系统。成模第 12 周,训练 4 天。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 2min 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)

立方形敞箱,高 40cm,长、宽均为 80cm,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 5min。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 7:00~12:00AM 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 免疫组化

取海马石蜡包埋,连续冠状切片,按博士德 SABC 试剂盒说明检测 SYP 在海马的表达。具体过程如下:常规脱蜡至水,3%过氧化氢灭活内源性酶,热修复后,正常山羊血清封闭,兔抗大鼠 SYP 一抗 (1 : 100)4℃过夜, 生物素化山羊抗兔 IgG25℃孵育 2h,SABC37℃孵育 25min,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。苏木素复染, 显微镜观察, 照相。北航医学图像分析管理系统 CM-2000B 进行图象分析统计处理, 每只动物随机分析 5 张切片,每张切片随机分析 5 个视野,计算平均光密度、面密度(目标面积 / 统计场面积)、数密度(目标个数 / 统计场面积)。

1.6 RT-PCR 法

大鼠断头,低温下快速取出海马组织,液氮冻存。称取 50mg 海马组织,提取总 RNA,进行 RT-PCR,synaptophysin 引物序列为 5' CAGCCGTGTTCGCTTTCAT 3',5' CCACC-CGTGGGATCTTCAT 3'。条件:94℃预变性 2min;94℃,30s;55℃退火 30s;72℃延伸 30s,30cycle;72℃再延伸 6min;4℃保存。取 PCR 产物 5μl 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-PC 电泳结果,用 Quantity One 软件测定 Volumn 值, 计算 synaptophysin/β-actin 比值。

1.7 统计学处理

全部数据采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 分析采用 SAS8.0 统计分析软件,ANOVA 分析,并作组间两两比较。

2 结 果

2.1 Morris 水迷宫测试结果(表 1)

表 1 各组空间搜索实验/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
正常对照组	10	25.31% ± 2.90%	3.33 ± 0.26	15.23 ± 2.73
糖尿病组	9	17.10% ± 5.36%[a]	2.27 ± 0.24[a]	30.05 ± 3.63[a]
糖尿病 + 尼莫地平组	12	23.05% ± 6.24%[bc]	3.14 ± 0.42[bc]	18.92 ± 2.60[bc]

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

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($P<0.05$)。尼莫地平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($P>0.05$)。

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 ($P<0.05$)。上述参数,尼莫地平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($P>0.05$)。

2.2 开野实验结果(表 2)

表 2 各组开野实验结果($\bar{x} \pm s$)

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	98.40 ± 51.55	11.20 ± 7.19	3.50 ± 2.27	1.20 ± 2.10
糖尿病组	9	95.33 ± 29.10[a]	10.89 ± 5.56[a]	2.89 ± 1.36[a]	1.44 ± 1.33[a]
糖尿病 + 尼莫地平组	12	97.50 ± 31.34[bc]	11.08 ± 6.05[bc]	3.42 ± 1.24[bc]	1.25 ± 3.08[bc]

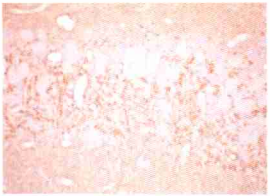
[a]:$P>0.05$,与正常对照组比较;[b]:$P>0.05$,与正常对照组比较;[c]:$P>0.05$,与糖尿病组比较

维普资讯 http://www.cqvip.com

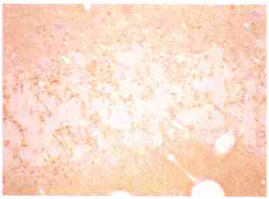
表 3 各组大鼠海马突触素蛋白和 mRNA 表达结果($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	突触素蛋白平均光密度	突触素蛋白面密度	突触素蛋白数密度	synaptophysin/β－actin mRNA 比值
正常对照组	10	0.23 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.0013 ± 0.0003	0.83 ± 0.13
糖尿病组	9	0.18 ± 0.02[a]	0.11 ± 0.04[a]	0.0009 ± 0.0003[a]	0.62 ± 0.21[a]
糖尿病＋尼莫地平组	12	0.22 ± 0.02[b,c]	0.14 ± 0.03[c]	0.0012 ± 0.0002[b,c]	0.80 ± 0.17[c]

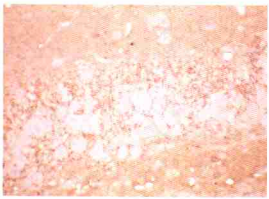
[a]：$P<0.05$，与正常对照组比较；[b]：$P>0.05$，与正常对照组比较；[c]：$P<0.05$，与糖尿病组比较



正常对照组



糖尿病组



尼莫地平组

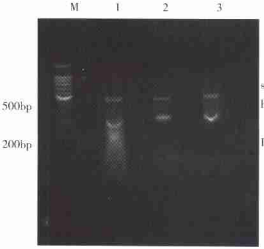
图 1 SYP 在大鼠海马组织的表达
（免疫组化 SABC 法染色×400）

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（$P>0.05$）。

2.3 免疫组化结果（表 3，图 1）

糖尿病组海马突触素阳性神经元光密度、面密度、数密度均降低，与正常对照组比较有显著性差异（$P<0.05$）。尼莫地平组与糖尿病组比较，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（$P>0.05$）。

2.4 突触素 mRNA 的表达（表 3，图 2）



1.正常对照组 2.糖尿病组 3.尼莫地平组

图 2 各组大鼠海马组织中表达突触素 mRNA 比较

糖尿病组海马突触素的 mRNA 表达明显受到抑制（$P<0.05$），经尼莫地平治疗后可显著提高突触素 mRNA 表达水平（$P<0.05$），差异具有统计学意义。

3 讨 论

糖尿病脑病由 Reske NE 和 Lundbaek k 最先提出[1]，临床上以认知障碍为特点，表现为学习记忆能力减退、空间时间定向困难，重者可发展为痴呆[1]。海马作为学习、记忆的重要解剖结构和神经中枢，与认知功能关系密切[2]。突触是神经元间信息传

维普资讯 http://www.cqvip.com

递的特化结构。突触素是一种与突触结构和功能密切相关的膜蛋白，分子量为 38KU，包括四个跨膜区，1985 年由 Jahn 等从大鼠脑突触囊泡中提取[4]。突触素在海马呈现颗粒状或点状免疫标记，突触素可作为突触前终末的特异性标记物，用来检测突触的密度和分布。突触素作为一种海马神经元突触前膜功能蛋白，参与多种与海马学习记忆功能有关的生理活动，包括突触的发生、Ca^{2+} 依赖性的神经递质的过程、长时程增强（Long-term potentiation，LTP）效应等[5]。

研究中，行为学测试结果提示糖尿病大鼠成模 12 周已出现明显的认知功能障碍。与正常对照组比较，糖尿病大鼠 Morris 水迷宫测试潜伏期明显增加（$P<0.05$），显示此时糖尿病大鼠学习能力已出现减退；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（$P<0.05$），表明糖尿病大鼠记忆能力也遭受损害。因为临床上糖尿病易合并抑郁症，我们在研究中首次引入抑郁症动物模型的经典筛选方法—Open-field 实验[6]，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。

实验观察了糖尿病大鼠海马突触素表达：免疫组化半定量分析发现糖尿病组海马区突触素蛋白表达减少，与国外研究结果一致[7]。我们用 RT-PCR 检测到糖尿病组海马突触素 mRNA 表达也明显受到抑制，国外未见类似报道。

研究通过免疫组化和 RT-PCR 检测到尼莫地平组与糖尿病组比较，海马突触素蛋白光密度、面密度、数密度和 synaptophysin/β－actin 的 mRNA 比值均显著增加（$P<0.05$），接近正常对照组（$P>0.05$），表明尼莫地平干预后 STZ 鼠突触素在蛋白水平和 mRNA 水平表达均增加。实验结果显示尼莫地平组 Morris 水迷宫测试成绩明显提高，与糖尿病组比较潜伏期明显缩短（$P<0.05$），中心区停留时间百分比和通过原平台位置次数增加显著（$P<0.05$），甚至接近正常组（$P>0.05$），显示尼莫地平早期干预可以有效提高糖尿病大鼠海马突触素表达，进而改善与突触素相关的学习记忆过程。尼莫地平改善糖尿病大鼠海马突触素表达和认知功能的机制目前尚不清楚，其可能的途径有（1）减轻 Ca^{2+} 超载对海马突触超微结构的损伤[8]。（2）增加突触后钙离子浓度，强化长时程增强效应[9]。（3）扩张脑血管，增加脑血流量，改善脑代谢，抵抗高血糖对神经元细胞、突触的损害[10]。（4）尼莫地平改善记忆功能的机制还可能与促进突触素的合成和突触的发生有关[8]。

综上所述，研究结果显示糖尿病大鼠学习记忆能力下降与海马区突触素表达有关，尼莫地平早期干预能有效阻止糖尿病所致海马突触素表达降低，延缓糖尿病大鼠学习记忆能力的衰退，为临床防治糖尿病脑病提供了新的方法和手段。但尼莫地平改变糖尿病大鼠突触素表达和行为学表现的具体机制还有待进一步探讨。

（通讯作者：肖 谦，男，教授，主任医师，博士，硕士生导师，主要研究方向：糖尿病慢性并发症研究。电话：89011252. E-mail:xiaoqian1956@126.com）

参 考 文 献

[1] Biessels GJ,van der Heide LP,Kamal A,et al.Ageing and diabetes:implications for brain function[J].Eur J Pharmacol,2002;441(1-2):1-14.

[2] Reske NE,Lundbaek k.Diabetic encephalopathy diffuse and focal lesions of the brain in long-term diabetes[J].Acta Neurol Scand,1963;39(4):SUPPL4:273-290.

[3] Ingelsson M,Fukumoto H,Newell KL,et al. Early Abeta accumulation and progressive synaptic loss,gliosis,and tangle formation in AD brain[J].Neurobiol Dis,2004;62(6):925-931.

[4] Jahn R,Schiebler W,Ouimet C,et al.A 38000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles[J].Proc Natl Acad Sci USA,1985;82(12):4137-4141.

[5] Boncristiano S,Calhoun ME,Howard V,et al.Neocortical synaptic bouton number is maintained despite robust amyloid deposition in APP23 transgenic mice[J].Neurobiol Aging,2005;26(5):607-613.

[6] Norte MC,Cosentino RM,Lazarini CA.Effects of methyl-eugenol administration on behavioral models related to depression and anxiety, in rats[J].Phytomedicine,2005;12(4):294-298.

[7] Nitta A,Murai R,Suzuki N,et al.Diabetic neuropathies in brain are induced by deficiency of BDNF[J].Neurotoxicol Teratol,2002;24(5):695-701.

[8] Hoogland TM,Saggau P.Facilitation of L-type Ca^{2+} channels in dendritic spines by activation of beta2 adrenergic receptors[J].J Neurosci,2004;24(39):8416-8427.

[9] Hsu KS,Ho WC,Huang CC,et al.Transient removal of extracellular $Mg^{(2+)}$elicits persistent suppression of LTP at hippocampal CA1 synapses via PKC activation[J].J Neurophysiol,2000;84(3):1279- 1288.

[10] Choudhary S,Verma SK,Raheja G,et al.The L-type calcium channel blocker nimodipine mitigates cytoskeletal proteins phosphorylation in dichlorvos-induced delayed neurotoxicity in rats[J].Basic Clin Pharmacol Toxicol,2006;98(5):447-455.