

吡格列酮对糖尿病大鼠中枢神经系统PPAR- γ 表达的影响

蔡雯雯 张京慧 江宏 李佳 石志华 钟历勇

【摘要】 目的 研究吡格列酮对糖尿病大鼠海马、下丘脑处PPAR- γ 表达的影响及与大鼠认知功能的关系。方法 雄性SD大鼠随机分为对照组(C组)、糖尿病组(D组)、糖尿病+吡格列酮组(DP组),每组10只。8周后行Morris水迷宫评价大鼠的空间学习记忆能力,Western Blot方法检测大鼠海马、下丘脑处PPAR- γ 表达水平。结果 Morris水迷宫中,D组大鼠逃避潜伏期较C组和DP组延长差异均有统计学意义($P < 0.05$)。大鼠海马和下丘脑处,PPAR- γ 的表达D组较C组减少,DP组较D组增多,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 吡格列酮能够增加糖尿病大鼠海马、下丘脑组织局部PPAR- γ 表达水平,并且这种表达的增加可能是吡格列酮改善糖尿病大鼠空间学习记忆能力的机制之一。

【关键词】 糖尿病; 中枢神经系统; PPAR- γ ; 认知功能; 吡格列酮

doi: 10.3969/j.issn.1009-6574.2017.01.010

Effects of pioglitazone on expressions of peroxisome proliferator-activated receptor- γ in central nervous system of diabetic rats QI Wen-wen, ZHANG Jing-hui, JIANG Hong, et al. Department of Gerontology, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China

【Abstract】 **Objective** To study the effects of pioglitazone on the expressions of peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) in hippocampus and hypothalamus of diabetic rats and to explore the association between pioglitazone and cognitive function. **Methods** Thirty male SD rats were equally randomized into control group (C group), diabetic group (D group) and diabetes+pioglitazone group (DP group). The spatial learning and memory function were tested by Morris water maze after 8 weeks. Expressions of PPAR- γ in hippocampus and hypothalamus were detected by Western Blot. **Results** In the Morris water maze, escape latencies of D group increased significantly compared to C group and DP group ($P < 0.05$). The expressions of PPAR- γ in hippocampuses and hypothalamuses of D group were significantly lower than C group and DP group ($P < 0.05$). **Conclusions** Pioglitazone could increase the expressions of PPAR- γ in hippocampus and hypothalamus of diabetic rats, which may be related to the improvement of spatial learning and memory function caused by pioglitazone.

【Key words】 Diabetes mellitus; Central nervous system; PPAR gamma; Cognitive function; Pioglitazone

过氧化物酶增殖物激活受体(Peroxisome Proliferator-activated Receptor, PPAR)是核激素受体超家族成员之一,在脂肪组织、心血管系统及中枢神经系统中皆有表达,PPAR- γ 是其中的一个亚型^[1-2]。吡格列酮(Pioglitazone)属于噻唑烷二酮药物,是PPAR- γ 的人工合成药物配体。研究表明,给予伴有2型糖尿病的阿尔茨海默病患者和遗忘型轻度认知功能障碍的患者口服吡格列酮(15~30 mg/d)治疗6个月,治疗组

较对照组认知功能有所改善^[3]。我们的前期研究也观察到,2型糖尿病大鼠认知功能水平下降,可能与中枢神经系统组织局部PPAR- γ 表达下降有关^[4]。因此,本实验通过观察吡格列酮对2型糖尿病大鼠认知功能的影响及对海马、下丘脑处PPAR- γ 表达的影响,为揭示其改善认知功能的作用机制提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 动物分组与处理 SPF级雄性SD大鼠30只(首都医科大学附属北京口腔医院动物实验中心提供),体质量180~220 g,随机分为3组:对照组(C组)、糖尿病组(D组)、糖尿病+吡格列酮组(DP组),每组

作者单位: 100038 首都医科大学附属北京世纪坛医院干部医疗暨老年医学科(蔡雯雯、张京慧、江宏、李佳、石志华); 首都医科大学附属北京天坛医院内分泌科(钟历勇)

通讯作者: 钟历勇 Email: zhongliyong@126.com

10只。D组及DP组按70 mg/kg体质量剂量予以腹腔注射链脲佐菌素(STZ),72 h后尾部采血测定即时血糖,血糖值大于16.7 mmol/L确定为糖尿病模型造模成功。STZ通过化学性破坏胰岛细胞而引起高血糖,是目前较为成熟的1型糖尿病造模方法^[5]。C组腹腔注射相应体积的无菌柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。DP组在D组基础上每日给予吡格列酮10 mg/(kg·d)灌胃8周。C组、D组同期2 ml生理盐水灌胃。3组大鼠在注射STZ及缓冲液前,禁食10 h,常规饲料喂养。药物干预8周后,评价大鼠一般状况,测定所有动物的体质量及随机血糖;用Morris水迷宫评价大鼠认知功能水平;行为学测试后,处死大鼠,Western Blot检测海马、下丘脑PPAR- γ 的表达。

1.2 方法

1.2.1 水迷宫实验 成功建模8周后,按照Morris水迷宫实验方法进行隐蔽平台试验,历时5 d,每天9:00开始实验,分别从水池的东、南、西、北4个点将大鼠面向池壁放入水中,使其自由游泳,寻找隐蔽于水中的平台,各组大鼠寻找并爬上平台所需时间,即逃避潜伏期。记录用秒表记录每天各组大鼠平均逃避潜伏期。前4 d为训练期,第5天进行正式测试,分别记录大鼠从4个点开始寻找平台的逃避潜伏期,每次间隔5 min,取平均值作为每只大鼠的平均逃避潜伏期。

1.2.2 脑组织标本的采集与处理 1.5%戊巴比妥钠腹腔注射大鼠麻醉(30 mg/kg),仰卧位固定。从颈椎处剪断颈髓,分离除去后颈部肌肉,仔细剔除颅骨取出脑组织放置冰上并分离出海马、下丘脑。

1.2.3 Western Blot 将海马或下丘脑组织称重,置入冰上的匀浆器中,加入10倍体积的组织裂解液,在冰上充分匀浆后裂解40 min,并不断混匀。12 000 r/min,4℃离心30 min后,取其上清液进行蛋白定量。采用Western Blot方法测定PPAR- γ 蛋白。用Multi Gauge V 3.0软件对目的蛋白条带进行半定量分析。 β -actin作为内参照。

1.3 统计学方法 采用SPSS 13.0统计软件分析数据。数据符合正态分布者以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,3组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用*t*检验。不符合正态分布者采用Kruskal-Wallis检验,以*M*(*P*₂₅,*P*₇₅)表示。*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠体质量、血糖情况 见表1。在成模时3组间体质量差异无统计学,3组间血糖差异有统计学意义。其中D组、DP组血糖较C组明显升高(*P*<0.01),D组与DP组间差异无统计学意义。建模及干预8周后,D组大鼠死亡1只,C组、DP组全部存

活。第8周时,3组间体质量、血糖水平差异均有统计学意义,其中与C组比较,DP组及D组体质量降低、血糖升高,差异有统计学意义(*P*<0.01),DP组与D组差异无统计学意义。

2.2 各组大鼠平均逃避潜伏期比较 在Morris水迷宫隐蔽平台实验中,3组间比较差异有统计学意义(*H*=21.62, *P*<0.01)。其中D组大鼠平均逃避潜伏期21.08(19.42, 30.22) s较C组8.77(6.73, 11.64) s延长,DP组大鼠平均逃避潜伏期13.43(11.84, 15.12)s较D组缩短,差异均有统计学意义(*P*<0.05),C组和DP组组间差异无统计学意义。

2.3 PPAR- γ 在大鼠海马、下丘脑处的表达 见图1,表2。大鼠海马及下丘脑处,PPAR- γ 的表达D组较C组减少,DP组较D组增多,差异均有统计学意义(*P*<0.05),而C组与DP组差异无统计学意义(*P*>0.05)。

表1 各组大鼠体质量、血糖水平比较($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | 0周 | | 8周 | |
|------------|--------------|-------------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| | 体质量(g) | 血糖(mmol/L) | 体质量(g) | 血糖(mmol/L) |
| C组 | 198 \pm 19 | 5.80 \pm 0.45 | 445 \pm 36 | 5.89 \pm 0.47 |
| D组 | 201 \pm 12 | 23.02 \pm 1.69 ^a | 308 \pm 30 ^a | 29.78 \pm 2.02 ^a |
| DP组 | 204 \pm 15 | 22.09 \pm 2.73 ^a | 290 \pm 40 ^a | 28.69 \pm 1.56 ^a |
| <i>F</i> 值 | 2.421 | 300.116 | 54.314 | 836.192 |
| <i>P</i> 值 | >0.05 | <0.01 | <0.01 | <0.01 |

注:与C组比较 a*P*<0.01

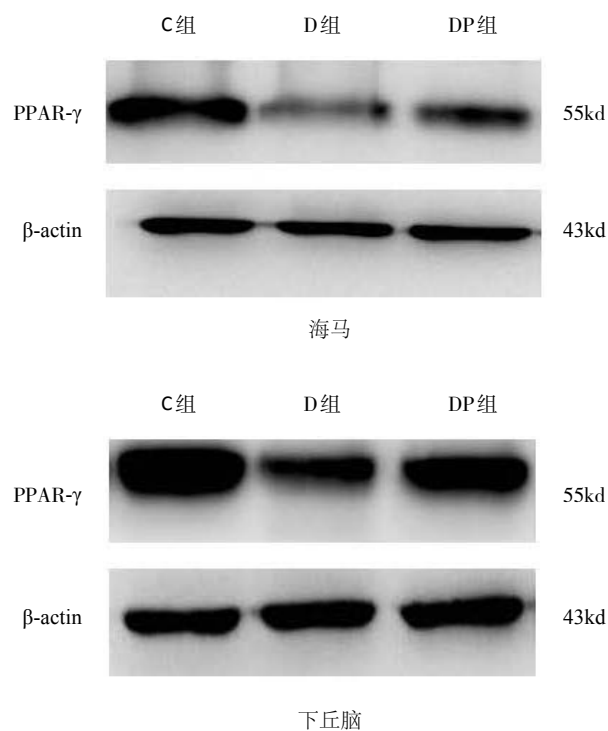


图1 PPAR- γ 在大鼠海马、下丘脑处的表达 Western Blot结果条带图

表2 各组大鼠PPAR- γ 的表达水平比较[$M(P_{25}, P_{75})$]

| 组别 | 海马 | 下丘脑 |
|-----|-------------------------------|-------------------------------|
| C组 | 1.04(0.83, 1.17) ^a | 0.98(0.87, 1.15) ^a |
| D组 | 0.55(0.42, 0.61) | 0.47(0.42, 0.57) |
| DP组 | 0.89(0.80, 1.02) ^b | 0.90(0.81, 0.96) ^b |
| F值 | 11.954 | 12.329 |
| P值 | <0.01 | <0.01 |

注:与D组比较 a P <0.01, b P <0.05

3 讨论

糖尿病除了可以合并心血管系统疾病、视网膜及肾脏疾病之外,还可以影响到中枢神经系统,导致认知功能水平的下降,被称作“糖尿病脑病”^[6],糖尿病认知功能水平下降的机制,以及如何改善认知功能,引起了学者们的广泛关注。吡格列酮属于噻唑烷二酮药物,通过改善胰岛素抵抗,增强胰岛素敏感性,增加外周组织对葡萄糖的转运而发挥降糖作用,是临床上常用的降糖药物。近年来,不仅如前所述,在临床中发现吡格列酮能够改善糖尿病患者的认知功能水平,在动物实验中,也屡有报道。Pathan等^[7]对STZ诱导的大鼠口服吡格列酮后,发现大鼠的认知功能水平改善。国内高飞等^[8]对2型糖尿病大鼠吡格列酮灌胃8周,证实吡格列酮能够改善糖尿病大鼠的空间记忆能力。我们的实验通过STZ诱导糖尿病大鼠,建模8周后,D组大鼠死亡1只,而D组及DP组大鼠相较C组,皆有血糖升高、体质量下降。在隐蔽平台试验中,D组大鼠寻找隐蔽平台的时间明显长于C组,而DP组寻找潜伏平台的时间短于D组,提示吡格列酮能够改善STZ诱导大鼠认知功能水平,与国内外报道一致。而STZ通过化学性破坏大鼠胰岛功能进而诱导糖尿病模型,导致内源性胰岛素的绝对不足,即使吡格列酮能够改善胰岛素敏感性,在此也不能有效降糖,这就能够解释为何DP组血糖较D组相比差异无统计学意义。

本次实验结果显示,D组较C组大鼠而言,PPAR- γ 水平在海马及下丘脑处表达皆下降,而DP组较D组比较,PPAR- γ 在海马及下丘脑处表达升高。进而推测吡格列酮通过升高中枢神经系统组织局部PPAR- γ 水平从而改善认知功能,而与外周血糖水平无关。而我们的前期研究也观察到,STZ诱导糖尿病模型后常规饲料喂养8周,较对照组而言,糖尿病组

大鼠认知功能水平下降,海马、下丘脑处11 β -羟类固醇脱氢酶1型(11 β -HSD1)表达增多,PPAR- γ 表达减少^[4]。11 β -HSD1在中枢神经系统组织局部能够使无活性的皮质酮还原成有活性的糖皮质激素,从而放大神经系统组织局部糖皮质激素的作用,高浓度糖皮质激素能够破坏认知功能^[9]。而国外研究证实,PPAR- γ 激动剂能够降低脂肪细胞中11 β -HSD1的水平^[10]进而推测,吡格列酮有可能通过降低中枢神经系统组织局部11 β -HSD1的水平,减少局部糖皮质激素的作用而改善认知功能,但有待进一步证实。

参 考 文 献

- [1] Stechschulte LA, Qiu B, Warrior M, et al. FKBP51 Null Mice Are Resistant to Diet-Induced Obesity and the PPAR γ Agonist Rosiglitazone[J]. *Endocrinology*, 2016, 157(10): 3 888-3 900.
- [2] Kharbanda C, Alam MS, Hamid H, et al. Novel Piperine Derivatives with Antidiabetic Effect as PPAR- γ Agonists[J]. *Chem Biol Drug Des*, 2016, 88(3): 354-362.
- [3] Hanyu H, Sato T, Kiuchi A, et al. Pioglitazone improved cognition in a pilot study on patients with alzheimer's disease and mild cognitive impairment with diabetes mellitus[J]. *J Am Geriatr Soc*, 2009, 57(1): 177-179.
- [4] Qi WW, Zhong LY, Li XR, et al. Hyperglycemia induced variations of 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ expression in hippocampus and hypothalamus of diabetic rats[J]. *Exp Diabetes Res*, 2012, 2 012: 107 130.
- [5] Ma LY, Lv YL, Huo K, et al. Autophagy-lysosome dysfunction is involved in A β deposition in STZ-induced diabetic rats[J]. *Behav Brain Res*, 2017, 320: 484-493.
- [6] Kamboj SS, Chopra K, Sandhir R. Neuroprotective effect of N-acetylcysteine in the development of diabetic encephalopathy in streptozotocin-induced diabetes[J]. *Metab Brain Dis*, 2008, 23(4): 427-443.
- [7] Pathan AR, Viswanad B, Sonkusare SK, et al. Chronic administration of pioglitazone attenuates intracerebroventricular streptozotocin induced-memory impairment in rats[J]. *Life Sci*, 2006, 79(23): 2 209-2 216.
- [8] 高飞, 王宏凯, 季兵, 等. 吡格列酮降低海马区raf-1激酶抑制蛋白改善2型糖尿病大鼠学习记忆[J]. *广州医学院学报*, 2011, 39(4): 27-30.
- [9] Caughey S, Harris AP, Seckl JR, et al. Forebrain-specific transgene rescue of 11 β -HSD1 associates with impaired spatial memory and reduced hippocampal BDNF mRNA levels in aged 11 β -HSD1 deficient mice[J]. *J Neuroendocrinol*, 2016.
- [10] Gurnell M. 'Striking the Right Balance' in Targeting PPAR gamma α /1a in the Metabolic Syndrome: Novel Insights from Human Genetic Studies[J]. *PPAR Res*, 2007, 2 007: 83 593.

(收稿日期: 2016-10-25)