

吡格列酮对糖尿病大鼠中枢神经系统11 β -羟类固醇脱氢酶1型表达的影响

綦雯雯 贾凯英 孙达 富晶 杨敏 潘磊

【摘要】 目的 研究吡格列酮对糖尿病大鼠海马、下丘脑处11 β -羟类固醇脱氢酶1型(11 β -HSD1)表达的影响及与认知功能的关系。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+吡格列酮治疗组(DP组),每组10只。8周后行Morris水迷宫评价大鼠的认知功能,Western Blot方法检测大鼠海马、下丘脑处11 β -HSD1表达水平。结果 Morris水迷宫中,D组大鼠穿越原平台区次数较C组减少,DP组大鼠较D组增多,差异有统计学意义($P < 0.01$)。在海马和下丘脑处,11 β -HSD1表达D组较C组增加,DP组较D组减少,较C组增加,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 吡格列酮能够降低糖尿病大鼠海马、下丘脑组织局部11 β -HSD1表达水平,并且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; 11 β -HSD1; 认知功能; 吡格列酮

doi: 10.3969/j.issn.1009-6574.2017.03.009

Effects of pioglitazone on expressions of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in central nervous system of diabetic rats QI Wen-wen, JIA Kai-ying, SUN Da, et al. Department of Gerontology, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China

【Abstract】 **Objective** To study the effects of pioglitazone (PGZ) on the expressions of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1(11 β -HSD1) in central nervous system of diabetic rats and its association with 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). Morris-water maze was used to test the cognitive function after 8 weeks. Western Blot was used to detect the expressions of 11 β -HSD1 in hippocampus and hypothalamus. **Results** In Morris water maze, the number of crossing the platform in D group were significantly less than C group and DP group ($P < 0.01$). The 11 β -HSD1 expressions in hippocampus and hypothalamus of D group were significantly increased than C group and DP group, while the 11 β -HSD1 expressions of DP group were significantly increased than C group ($P < 0.01$). **Conclusion** Pioglitazone may improve cognitive function in diabetic rats, partly through the decrease of 11 β -HSD1 expressions in hippocampus and hypothalamus.

【Key words】 Diabetes mellitus; Central nervous system; 11 β -HSD1; Cognitive function; Pioglitazone

11 β -羟类固醇脱氢酶1型(11 β -HSD1)是糖皮质激素的调节酶,主要分布在脂肪组织、肝脏及中枢神经系统中^[1]。能够使无活性的11-酮还原成有活性的糖皮质激素,从而放大中枢神经系统组织局部糖皮质激素水平^[2]。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,是一种配体活化的转录因子,通过调节基因转录而发挥作用,在中枢神经系统、脂肪组织中皆有表达,PPAR- γ 是其中的

一个亚型^[3-4]。吡格列酮属于噻唑烷二酮药物,是PPAR- γ 的人工合成药物配体,也是临床常用的降糖药物^[5]。

糖尿病随着病程的进展可影响中枢神经系统,被称为糖尿病脑病。研究证实糖尿病脑病与阿尔茨海默病(AD)之间存在着许多内在的联系。因研究发现AD患者脑组织中胰岛素水平及胰岛素受体下降,进而造成胰岛素信号通路的下降,导致胰岛素抵抗,影响脑代谢及认知功能,与2型糖尿病发病机制类似,故有学者称AD为“3型糖尿病”或者“大脑糖尿病”^[6]。现有研究表明,AD的发病机制与中枢神经系统组织局部A β 蛋白及11 β -HSD1

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

通讯作者: 潘磊 Email: crystalqww@sina.com

有关^[7], PPAR- γ 激动剂可以改善AD小鼠模型的认知功能障碍^[8], 那么糖尿病的认知功能障碍是否也与11 β -HSD1和PPAR- γ 有关呢? 多项研究证明, PPAR- γ 激动剂吡格列酮能够改善糖尿病认知功能障碍^[9], 但目前国内外关于吡格列酮改善糖尿病认知功能的研究靶点多集中在A β 蛋白^[10]、糖基化终末产物^[11]、炎症标志物^[9]等方面, 鲜有关注11 β -HSD1、PPAR- γ 及认知功能三者关系的研究。我们的前期研究发现, 吡格列酮能够改善糖尿病大鼠认知功能水平, 增加糖尿病大鼠海马、下丘脑组织局部PPAR- γ 表达水平, 并且PPAR- γ 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^[12]。因此, 本实验在此基础上进一步观察吡格列酮对2型糖尿病大鼠认知功能的影响及对海马、下丘脑处11 β -HSD1表达的影响, 为揭示其改善认知功能的作用机制提供新的研究思路。

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, 按照随机数字表法分为3组: 对照组(C组)、糖尿病组(D组)、糖尿病+吡格列酮治疗组(DP组), 每组10只。链脲佐菌素(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^[13]。D组: 按70 mg/kg体质量剂量予以腹腔注射STZ, 72 h后尾部采血测定即时血糖, 血糖值>16.7 mmol/L确定为糖尿病模型造模成功。DP组: 参照D组造模方法, 建立糖尿病模型, 同时每日给予吡格列酮10 mg/(kg·d)灌胃。C组腹腔注射相应体积的无菌柠檬酸-枸橼酸钠缓冲液。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水迷宫进行空间探索实验, 评价大鼠认知功能水平(6 d); 行为学测试后, 处死大鼠, Western Blot检测海马、下丘脑11 β -HSD1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水迷宫的实验方法进行空间探索试验。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, 寻找隐藏于水中的平台, 前5 d是记忆训练过程。第6天撤出平台, 进行空间探索试验。将大鼠从正北处放入水中, 记录大鼠穿越原平台区的次数, 并进行统计。

1.2.2 脑组织标本采集 1.5%戊巴比妥钠腹腔注射大鼠麻醉(30 mg/kg), 仰卧位固定。从颈椎处剪断脊髓, 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印迹杂交 将海马、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 $^{\circ}$ C离心30 min后, 取其上清液进行蛋白定量。采用Western Blot方法测定11 β -HSD1蛋白。用Multi Gauge V3.0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统计分析软件分析数据。计量资料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。以 $P < 0.05$ 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 参见本课题组已发表文章^[12]。

2.2 各组大鼠空间探索实验比较 在空间探索实验中, 测试大鼠1 min内穿越原平台区次数, 3组间比较差异有统计学意义($F=9.69, P < 0.01$)。D组大鼠穿越原平台区次数(1.78 \pm 1.09), 较C组(3.90 \pm 1.20)减少, DP组大鼠穿越原平台区次数(3.40 \pm 0.97)较D组增多, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。C组及DP组之间差异无统计学意义($P=0.32$)。

2.3 11 β -HSD1在大鼠海马、下丘脑处的表达 见图1, 表1。大鼠海马及下丘脑处, 11 β -HSD1的表达D组较C组增高, DP组较D组减少, 较C组增高, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

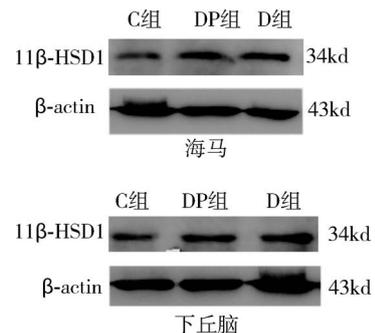


图1 11 β -HSD1在大鼠海马、下丘脑处的表达
Western Blot结果条带图

表1 11 β -HSD1在大鼠海马、下丘脑处的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	海马	下丘脑
C组	0.99 \pm 0.23	1.06 \pm 0.22
D组	1.93 \pm 0.23*	1.89 \pm 0.15*
DP组	1.50 \pm 0.12**	1.54 \pm 0.14**
F值	15.17	32.06
P值	<0.01	<0.01

注: 与C组比较* $P < 0.01$; 与D组比较# $P < 0.01$

3 讨论

本研究中发现,在Morris水迷宫试验中,D组大鼠穿越原平台区次数较C组减少,DP组大鼠较D组增多。提示吡咯列酮能够改善高血糖诱导的大鼠认知功能水平下降,与目前相关报道一致^[9]。Western Blot结果显示,无论在海马或者下丘脑处,D组大鼠11 β -HSD1的表达较C组增高,而DP组11 β -HSD1的表达较D组减少,进而推测糖尿病大鼠认知功能障碍可能与海马、下丘脑11 β -HSD1表达增多有关,而吡咯列酮通过降低这种异常表达从而改善认知功能,而与外周血糖水平无关。

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^[2],但高浓度糖皮质激素对认知功能有不利影响^[14]。我们的前期研究观察到,STZ诱导糖尿病模型后常规饲料喂养8周,较对照组而言,糖尿病大鼠认知功能水平下降,海马、下丘脑处PPAR- γ 表达减少^[15]。而吡咯列酮干预后,能够增加大鼠海马、下丘脑处PPAR- γ 表达^[12]。体外实验证实,胎鼠海马神经元细胞原代培养7 d后给予80 mmol/L高浓度葡萄糖诱导11 β -HSD1高表达模型,予PPAR- γ 激动剂吡咯列酮(0.1, 1.0, 5.0 μ mol/L)干预,结果显示随着吡咯列酮浓度的升高,11 β -HSD1酶的表达及转化率逐渐下降^[16],这对PPAR- γ 激动剂与11 β -HSD1的关系有了一定提示。而本实验则从体内实验证明高血糖引起海马、下丘脑处组织局部11 β -HSD1增高的异常表达,进而放大中枢神经系统组织局部糖皮质激素水平,推测可能是高血糖影响认知功能障碍的原因之一。吡咯列酮通过降低海马、下丘脑处组织局部11 β -HSD1的异常表达,减少局部高水平糖皮质激素对海马、下丘脑等组织的破坏从而改善认知功能,推测可能是吡咯列酮改善认知功能障碍的原因之一。

参 考 文 献

- [1] Yuan X, Li H, Bai H, et al. The 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor protects against the insulin resistance and hepatic steatosis in db/db mice[J]. Eur J Pharmacol, 2016, 788: 140-151.
- [2] Wang Y, Yang H, Li W, et al. Zuogui Jiangtang Jieyu Formulation Prevents Hyperglycaemia and Depressive-Like Behaviour in Rats by Reducing the Glucocorticoid Level in Plasma and Hippocampus[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2015, 2015: 158-361.
- [3] Stechschulte LA, Qiu B, Warriar M, et al. FKBP51 Null Mice Are Resistant to Diet-Induced Obesity and the PPAR γ Agonist Rosiglitazone[J]. Endocrinology, 2016, 157(10): 3888-3900.
- [4] 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.
- [5] Maganti AV, Tersey SA, Syed F, et al. Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ Activation Augments the β -Cell Unfolded Protein Response and Rescues Early Glycemic Deterioration and β Cell Death in Non-obese Diabetic Mice[J]. J Biol Chem, 2016, 291(43): 22524-22533.
- [6] 王蓉, 金贺. 胰岛素信号通路与阿尔茨海默病[J]. 神经疾病与精神卫生, 2016, 16(6): 621-623.
- [7] Sooy K, Noble J, McBride A, et al. Cognitive and Disease-Modifying Effects of 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Inhibition in Male Tg2576 Mice, a Model of Alzheimer's Disease[J]. Endocrinology, 2015, 156(12): 4592-4603.
- [8] Skerrett R, Pellegrino MP, Casali BT, et al. Combined Liver X Receptor/Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Agonist Treatment Reduces Amyloid β Levels and Improves Behavior in Amyloid Precursor Protein/Presenilin 1 Mice[J]. J Biol Chem, 2015, 290(35): 21591-21602.
- [9] Zhang Z, Yuan H, Zhao H, et al. PPAR γ activation ameliorates postoperative cognitive decline probably through suppressing hippocampal neuroinflammation in aged mice[J]. Int Immunopharmacol, 2017, 43: 53-61.
- [10] Gad ES, Zaitone SA, Moustafa YM. Pioglitazone and exenatide enhance cognition and downregulate hippocampal beta amyloid oligomer and microglia expression in insulin-resistant rats[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2016, 94(8): 819-828.
- [11] Liu X, Luo D, Zheng M, et al. Effect of pioglitazone on insulin resistance in fructose-drinking rats correlates with AGEs/RAGE inhibition and block of NADPH oxidase and NF kappa B activation[J]. Eur J Pharmacol, 2010, 629(1/3): 153-158.
- [12] 綦雯雯, 张京慧, 江宏, 等. 吡咯列酮对糖尿病大鼠中枢神经系统PPAR- γ 表达的影响[J]. 神经疾病与精神卫生, 2017, 17(1): 34-36.
- [13] 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.
- [14] Caughey S, Harris AP, Seckl JR, et al. Forebrain-Specific Transgene Rescue of 11 β -HSD1 Associates with Impaired Spatial Memory and Reduced Hippocampal Brain-Derived Neurotrophic Factor mRNA Levels in Aged 11 β -HSD1 Deficient Mice[J]. J Neuroendocrinol, 2017, 29(1).
- [15] Qi WW, Zhong LY, Li XR, et al. Hyperglycemia induces the 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, 2012: 107-130.
- [16] 熊丽娇, 钟历勇. PPAR- γ 激动剂对高浓度葡萄糖环境下原代培养胎鼠海马神经元细胞11 β -HSD1表达影响的研究[G]. 中华医学会第十二次全国内分泌学学术会议, 西安, 2013: 206.

(收稿日期: 2017-01-16)