

# 慢性脑低灌注对 2 型糖尿病模型大鼠空间学习记忆能力的影响及胆碱能神经元损伤的机制探讨

李玉梅<sup>1</sup>, 张 婷<sup>1</sup>, 肖品品<sup>1</sup>, 张 潇<sup>2</sup>, 付剑亮<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>上海交通大学附属上海市第六人民医院神经内科200233; <sup>2</sup>中国科学院上海生命科学研究院 200031)

**关键词** 糖尿病; 慢性脑低灌注; 认知功能障碍; 乙酰胆碱转移酶; 胆碱能神经元; 空间学习记忆

**摘要** 目的 探讨2型糖尿病(DM)是否加重慢性脑低灌注(CCH)大鼠胆碱能神经元及空间学习记忆能力损伤。方法 SD大鼠 24 只, 随机分为 4 组(均  $n=6$ ): 对照组(正常饮食+假手术); DM 组[高脂饮食+链脲佐菌素(STZ)]; CCH 组[正常饮食+双侧颈总动脉永久性结扎(2-VO)]; DM-CCH 组(高脂饮食+STZ+2-VO)。采用 Morris 水迷宫测试各组大鼠学习记忆能力; 免疫组化法检测海马区乙酰胆碱转移酶(ChAT)阳性细胞表达和免疫印迹法检测海马 ChAT 相对表达量。结果 DM+CCH 组逃避潜伏期与对照组比较明显延长, 第 2~4 天( $P<0.001$ )、第 5 天( $P<0.01$ ); 目标象限时间百分比明显低于对照组( $P<0.01$ )、DM 组( $P<0.05$ )和 CCH 组( $P<0.05$ )。DM+CCH 组海马区 ChAT 阳性细胞表达明显减少, ChAT 相对表达量较对照组显著减少( $P<0.01$ )、DM 组( $P<0.05$ )和 CCH 组( $P<0.05$ )显著减少。结论 DM 可加重 CCH 大鼠的空间学习记忆能力障碍, 可能与海马区胆碱能神经元损伤有关。

**Aggravation of Spatial Learning and Memory Impairment by Type 2 Diabetes in Rats with Chronic Cerebral Hypoperfusion is Associated with Cholinergic Neuron Injury** LI Yu-mei<sup>1</sup>, ZHANG Ting<sup>1</sup>, XIAO Pin-pin<sup>1</sup>, ZHANG Xiao<sup>2</sup>, FU Jian-liang<sup>1</sup> <sup>1</sup>Department of Neurology, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233; <sup>2</sup>Shanghai Institutes for Biological Sciences, Shanghai 200031, China

**KEY WORDS** diabetes; chronic cerebral hypoperfusion; cognitive impairment; choline acetyltransferase; cholinergic neuron; spatial learning and memory

**ABSTRACT** **Aim** To explore whether type 2 diabetes elicits cholinergic neuron injury, spatial learning and memory impairment in rats with chronic cerebral hypoperfusion. **Methods** 24 SD rats were randomly divided into 4 groups ( $n=6$  in each group): Control group (normal diet + sham); DM group (high-fat diet+STZ injection); CCH group (normal diet+2-VO); DM + CCH group (high-fat diet+STZ injection+2-VO). All rats were submitted to behavioral testing for spatial memory in Morris water maze. Immunohistochemical staining was used to detect hippocampal ChAT positive cells expression. The relative expression of ChAT in hippocampus were detected with Western blotting. **Results** Escape latency of DM+CCH group was significantly longer than other groups (from the 2nd to 4th day,  $P<0.001$ ; at day 6,  $P<0.01$ ); the percentage

[文章编号] 1008-0678(2013)06-0614-06 [中图分类号] R743 [文献标识码] A  
[基金项目] 上海市医学会“神经疾病转化研究”科学基金资助课题(编号:SHNR-006)  
[作者简介] 李玉梅,女(1986-),神经内科硕士研究生,主要从事老年性痴呆的基础与临床研究。  
[通讯作者] 付剑亮,E-mail:fujianliang@163.com

of time in the target quadrant was significantly reduced compared with the control group ( $P < 0.01$ ), CCH group ( $P < 0.05$ ) and DM group ( $P < 0.05$ ). Compared with other groups, ChAT-positive cells significantly reduced in the hippocampus of DM+CCH group. The relative expression of ChAT in the hippocampus of the DM+CCH group decreased statistically, compared with the control group ( $P < 0.01$ ), DM group ( $P < 0.05$ ) and CCH group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Diabetes exacerbates spatial learning and memory impairment in rats with chronic cerebral hypoperfusion, which may be related to hippocampal cholinergic neuron injury.

慢性脑低灌注(chronic cerebral hypoperfusion, CCH)可引起脑血流量的下降和记忆障碍,被认为是痴呆的重要原因。在大鼠脑缺血模型中,双侧颈总动脉永久性结扎(two-vessel occlusion, 2-VO)能使大脑皮质血流减少35%~45%,海马区减少60%左右<sup>[1-4]</sup>,进而引起进行性的认知功能障碍,而这些行为学的改变可能与脑内乙酰胆碱转移酶(choline acetyltransferase, ChAT)的减少相关。2型糖尿病(DM)除血糖升高外,另一个重要特征是胰岛素抵抗<sup>[5]</sup>,患者常伴发其他血管病危险因素,如高血压病、血脂障碍、肥胖等,加重患者患阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的风险<sup>[6]</sup>,本实验构建Sprague-Dawley(SD)大鼠糖尿病慢性脑低灌注(DM-CCH)模型,模拟临床上常见的DM伴发CCH的病理状态,观察DM对CCH大鼠学习记忆能力的影响及胆碱能神经元损伤的机制。

### 材料与方 法

**实验材料及试剂** 雄性清洁级SD大鼠(上海西普尔必凯实验动物有限公司)35只,体重(220 ± 20)g。高脂饲料(40%脂肪供能。配方:繁殖鼠料546 g·kg<sup>-1</sup>,猪油169 g·kg<sup>-1</sup>,蔗糖140 g·kg<sup>-1</sup>,酪蛋白102 g·kg<sup>-1</sup>,预混料21 g·kg<sup>-1</sup>,麦芽糊精22 g·kg<sup>-1</sup>)和正常饲料(10%脂肪供能)购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。链脲佐菌素(STZ, Sigma; USA),兔抗鼠ChAT抗体(Millipore, USA),兔抗鼠GAPDH抗体(北京康为世纪生物科技有限公司,中国),辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG(Jackson, USA),Western及IP细胞裂解液和BCA蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术研究所,中国),ECL化学发光底物(Thermo, USA)。7600 HITACHI自动生化分析仪(日立,日本);大鼠胰岛素ELISA试剂盒(上海冠泰生物科技有限公司,中国);Morris水迷宫(淮北正华生物仪器设备有限公司,中国)。

**实验动物分组** 大鼠随机分为4组(均n=6):对照组(正常饮食1个月后腹腔注射生理盐水+假手术);

DM组(高脂饮食+STZ); CCH组(正常饮食1个月后腹腔注射生理盐水+2-VO); DM-CCH组(高脂饮

食+STZ+2-VO)。

### DM和CCH大鼠模型制备

1. DM模型的制备<sup>[7]</sup>:给予DM组和DM-CCH组20只大鼠高脂饮食1个月后,禁食12h以上,按35 mg·L<sup>-1</sup>剂量腹腔注射1% STZ(STZ溶于0.1 mol·L<sup>-1</sup>的柠檬酸缓冲液中, pH4.5)。DM大鼠成模1个月后心脏采血,测空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)、空腹胰岛素(fasting serum insulin, FSI)、三酰甘油(triglycerides, TG)、胆固醇(total cholesterol, TC)等水平。

DM成模标准:按Srinivasan等<sup>[7]</sup>方法于注药72h及1周后检测大鼠随机血糖,血糖连续2次超过16.7 mmol·L<sup>-1</sup>者为DM模型成功。

2. CCH模型制备<sup>[8]</sup>:大鼠制成DM模型后2周,按Ni等<sup>[8]</sup>方法进行2-VO术。术前12h禁食,自由饮水。10%水合氯醛4 mL·kg<sup>-1</sup>腹腔注射麻醉大鼠,仰卧位固定于鼠台,剪毛备皮,聚维酮碘、75%乙醇常规消毒。颈正中线做约1 cm长切口,钝性分离皮下组织,分离双侧颈总动脉,以4号丝线双重结扎。术中避免钳夹和过分牵拉迷走神经,注意无菌原则,行间断缝合。术后3d每天以碘酊消毒伤口及周围皮肤。

对照组:假手术仅做颈前切口、钝性分离,而不结扎双侧颈总动脉。

在20只高脂喂养1个月的大鼠中,1只体重未能超过300g被剔除;注射STZ3d及1周后、2-VO前测空腹血糖未能达16.7 mmol·L<sup>-1</sup>者共2只被剔除,成模率为85.0%(17/20只)。17只DM成模大鼠中(6只为对照组)取11只和15只正常饮食大鼠中(6只为CCH组)取9只行2-VO后,1只出现偏瘫被剔除;死亡7只,死亡率为35.0%(7/20只)。

Morris水迷宫<sup>[9]</sup>测试大鼠的空间学习记忆能力 测试于成模3周后进行。Morris水迷宫水池直径180 cm,高50 cm,水深30 cm,水温(22 ± 2)。水池分为4个象限:N、E、S、W(图1),在第3象限(SW-)正中放置一个顶端平面为10 cm × 10 cm平台,平台高度28 cm,没于水面下2 cm,并在水中加入黑色墨水至见不到平台,水池周围参照物保持不变。

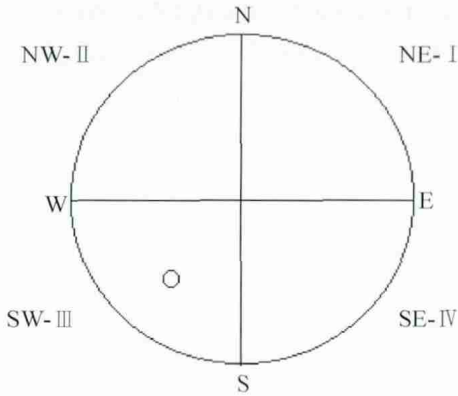


图1 水迷宫示意图

Fig 1 Schematic diagram of Morris water maze

1. 定位航行实验：实验历时 5 d，每天下午为 1 个实验系列(每个系列重复 4 次)。操作者将大鼠面向池壁，随机从 SE、NW、N、E 4 个方向入水(表 1)。大鼠发现平台后在平台上站立 20 s，操作者将大鼠拿出休息 60 s，再由下一象限入水进行实验，如果 90 s 内找不到平台，则由操作者帮助大鼠站上平台(潜伏期最高分记为 90 s)。记录大鼠找到平台的时间，取 4 次平均值即为逃避潜伏期。

2. 空间探索实验：实验第 6 天撤去平台，取原设平台对面的象限，投大鼠于水池中，记录 90 s 内大鼠穿过平台所在象限(目标象限)的时间，计算目标象限游泳时

表 1 水迷宫中大鼠开始位置

Tab 1 Starting position of rats in Morris water maze

天数 Day	方向 Direction			
	系列 1 Trial 1	系列 2 Trial 2	系列 3 Trial 3	系列 4 Trial 4
1	N	E	SE	NW
2	SE	N	NW	E
3	NW	SE	E	N
4	E	NW	N	SE
5	N	SE	E	NW
6	NE			

间与总游泳时间(90 s)的比值。为排除视觉损伤对游泳成绩的影响，另进行可视平台实验，即让平台露出水面 1 cm，观察大鼠 1 min 内到达平台的时间。

海马组织切片的制备 标本采集于水迷宫检测结束第 2 天进行。用 10% 水合氯醛(4 mL·kg<sup>-1</sup>)腹腔注射麻醉大鼠，经左心室插管至升主动脉，生理盐水 250 mL 快速灌注冲洗至清澈，断头取脑，从中线分为两个半脑。将其中一半置于 4% 多聚甲醛中浸泡固定 12~24 h，二甲苯透明、乙醇脱水，浸蜡、包埋，作连续冠状脑切片(厚 4 μm)，用于免疫组化分析；另一半按参考文献[10]方法分离海马组织(后保存于 -80 °C 冰箱，用于蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测)。

免疫组化 ChAT 阳性细胞检测<sup>[11]</sup> 石蜡切片常规脱蜡入水后，3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温孵育 10 min，热修复抗原；滴加正常山羊血清封闭液 1 h；加入一抗 ChAT(1:3 000)，4 °C 过夜；加二抗 IgG(1:300)室温孵育 2 h，滴加 SABC<sub>37</sub> 孵育 30 min；DAB 呈色；每步骤间用 0.01 mol·L<sup>-1</sup> PBS 洗 5 min，× 3 次；脱水透明，中性树脂封片，阴性对照为用正常山羊血清代替一抗，余步骤同上。

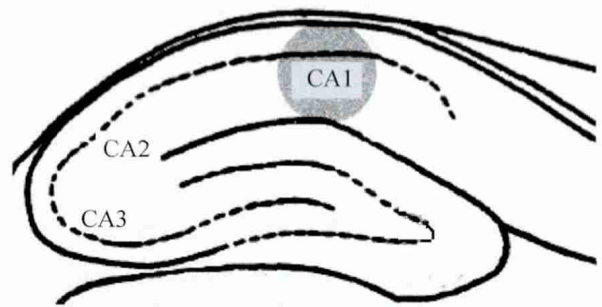


图2 海马CA1区示意图

Fig 2 Schematic diagram of hippocampal CA1 region

在显微镜下，ChAT 为棕黄色阳性颗粒分布于神经元的胞质中，随机选取海马 CA1 区(图 2)3 个不重叠视野观察 ChAT 阳性细胞的表达。

Western blot法<sup>[11]</sup>观察ChAT蛋白相对表达 Western blot 实验步骤严格按照说明书进行。取 50~100 mg 脑组织加入 0.8 mL 裂解液，匀浆离心后取上清液。BCA 蛋白浓度测定试剂盒定量后，按每孔 40 μg 蛋白进行变性上样。凝胶电泳(5% 的浓缩胶 60 V，30 min；10% 的分离胶 120 V，90 min)，湿转法(100 V，60 min)将蛋白转

移至硝酸纤维素膜上。50 g·L<sup>-1</sup> 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加入兔抗鼠 ChAT 抗体(1:1 000), 4 过夜。PBS 洗 5 min, × 3 次后加入辣根过氧化物酶结合的山羊抗兔 IgG(1:5 000), PBS 洗 5 min, × 3 次后加入 ECL 化学发光底物 1 min, X 线曝光。采用 ImageJ 2.1.4.7 软件分析条带灰度值, 计算目的蛋白 ChAT 与内参蛋白 GAPDH 灰度的比值。所有蛋白质免疫印迹的结果都在同组不同样品上得到重复。

**统计学方法** 采用 SPSS15.0 软件进行统计学分析。所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组比较采用两独立样本的 *t* 检验, 多组比较采用单因素方差分析, *P*<0.05 为差异有统计学意义。

### 结 果

**各组大鼠各项生化指标的比较** DM 大鼠(包括 DM 组和 DM-CCH 组)的生化指标均显著高于非 DM 大鼠(包

括对照组和 CCH 组), *P*<0.05(表 2)。

**Morris 水迷宫测试** 在定位航行实验中, DM-CCH 组大鼠逃避潜伏期明显长于对照组, 第 2~4 天(54.60 ± 3.77 vs 25.99 ± 4.15、45.39 ± 4.35 vs 27.50 ± 4.39、39.71 ± 3.42 vs 20.34 ± 3.69, 均 *P*<0.001)、第 5 天(41.43 ± 4.41 vs 11.35 ± 3.95, *P*<0.01), 见图 3A。空间探索性实验中, DM-CCH 组大鼠在目标象限游泳时间百分比明显低于对照组(22.71 ± 3.46 vs 43.39 ± 3.33, *P*<0.01)、DM 组(22.71 ± 3.46 vs 36.41 ± 3.09, *P*<0.05)和 CCH 组(22.71 ± 3.46 vs 37.39 ± 3.42, *P*<0.05), 见图 3B。在可视平台实验中, 所有大鼠到达平台的时间均在 30 s 以内, 各组间无显著差异, 表明排除了视觉损伤对游泳行为的影响。

DM-CCH 组大鼠海马 ChAT 阳性细胞表达明显减少 在光学显微镜下, 各组大鼠海马切片中均可见棕黄

表 2 DM 大鼠(DM 组和 DM-CCH 组)与非 DM 大鼠(对照组和 CCH 组)各项指标的比较

Tab 2 Comparison of the indicators in DM rats (DM group and DM-CCH group) and non-DM rats (the control group and CCH group)

项目 Item	非 DM 大鼠 Non-DM rats	DM 大鼠 DM rats
空腹血糖(mmol·L <sup>-1</sup> ) Fasting blood glucose(mmol·L <sup>-1</sup> )	5.16±0.52	19.68±0.28 <sup>1</sup>
空腹胰岛素(ng·mL <sup>-1</sup> ) Fasting serum insulin(ng·mL <sup>-1</sup> )	0.52±0.17	0.89±0.15 <sup>1</sup>
三酰甘油(mmol·L <sup>-1</sup> ) Triglycerides(mmol·L <sup>-1</sup> )	0.80±0.26	2.52±0.49 <sup>1</sup>
胆固醇(mmol·L <sup>-1</sup> ) Total cholesterol(mmol·L <sup>-1</sup> )	1.34±0.38	1.99±0.29 <sup>1</sup>

注: 与非 DM 大鼠比较, <sup>1</sup>*P*<0.05

Notes: Compared with non-DM rats, <sup>1</sup>*P*<0.05.

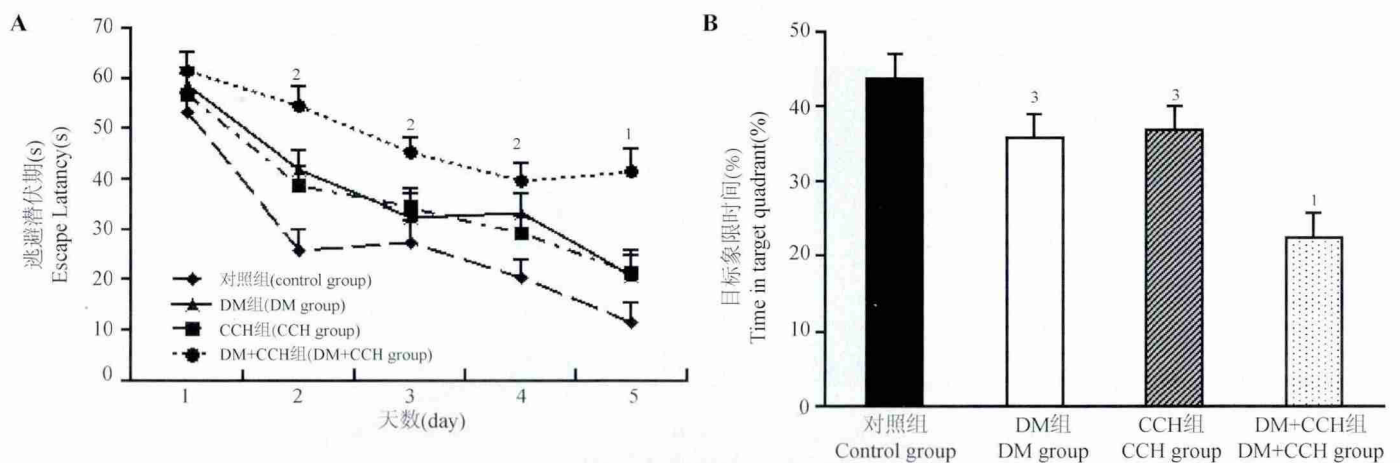


图 3 各组大鼠术后 4 周 Morris 水迷宫实验结果

Fig 3 The results of Morris water maze 4 weeks after the 2-VO

注: 与对照组比较, <sup>1</sup>*P*<0.01, <sup>2</sup>*P*<0.001; 与 DM-CCH 组比较, <sup>3</sup>*P*<0.05

Notes: Compared with the control group, <sup>1</sup>*P*<0.01, <sup>2</sup>*P*<0.001; Compared with the DM-CCH group, <sup>3</sup>*P*<0.05

色阳性颗粒分布于神经元的胞质中，对照组大鼠海马CA1区ChAT的阳性细胞的表达明显高于其他各组，而DM-CCH组CA1区细胞核固缩，染色深，结构不清，几乎未见阳性细胞，DM组和CCH组也出现阳性神经元数量减少，分布稀疏，显色浅(图4)。

DM-CCH组大鼠海马ChAT的相对表达量显著减少 与对照组比较,DM-CCH组神经元中ChAT的相对表达量显著减少,差异有显著统计学意义( $P<0.01$ );与DM组和CCH组比较表达量亦减少,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见图5。

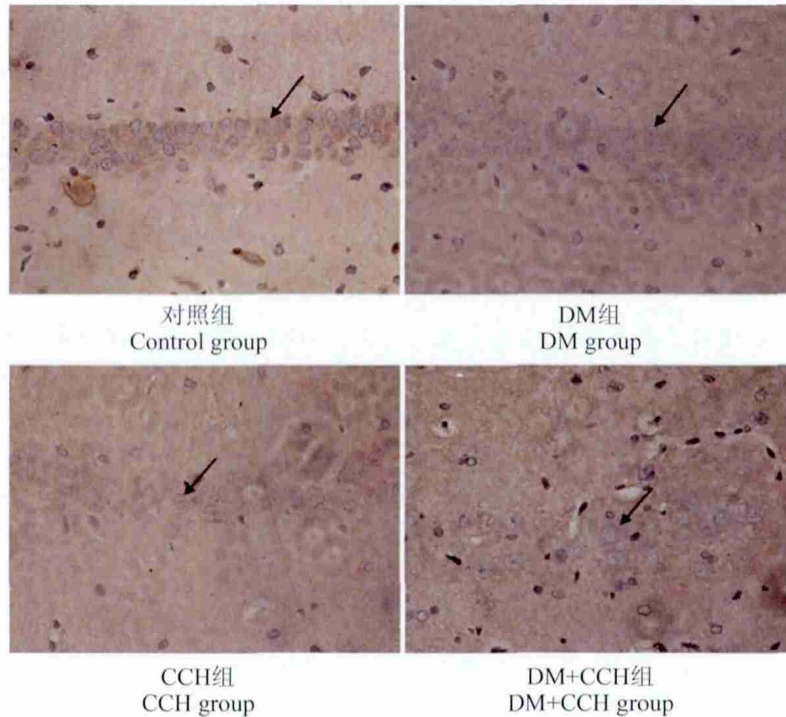


图4 各组大鼠脑组织海马区中ChAT的表达(免疫组化染色, ×400)  
Fig 4 Expression of ChAT in rats hippocampus (Immunohistochemical, ×400)

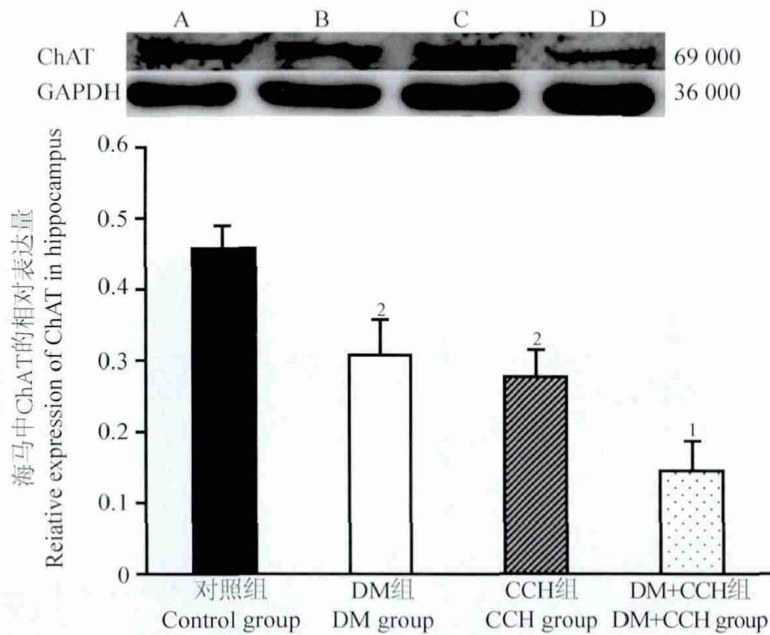


图5 海马中ChAT的相对表达量  
Fig 5 Relative expression of ChAT in hippocampus

注: A 为对照组; B 为DM组; C 为CCH组; D 为DM-CCH组; 与对照组比较, <sup>1</sup> $P<0.01$ ; 与DM-CCH组比较, <sup>2</sup> $P<0.05$   
Notes: A. Control group; B. DM group; C. CCH group; D. DM+CCH group; Compared with the control group, <sup>1</sup> $P<0.01$ ; Compared with DM+CCH group, <sup>2</sup> $P<0.05$

## 讨 论

有研究证明, CCH 所引起的进行性认知功能损害及长时程的记忆障碍在 2-VO 结扎后 3 至 6 个月后才明显<sup>[12]</sup>。而本研究使实验大鼠在 DM 基础上再处于 CCH 状态下, 于 3 周后经水迷宫实验检测结果发现与对照比较, DM-CCH 组大鼠出现行为学改变, 逃避潜伏期明显延长和目标象限时间百分比明显缩短, 差异有显著统计学意义( $P < 0.01$ ), 大鼠表现出明显的记忆功能障碍(图 1), 且 DM 组和 CCH 组与对照组比较无明显差异, 说明 DM 可以加重 CCH 引起的记忆功能障碍。

乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)是中枢胆碱能神经递质, 参与信息的传递和处理。ACh 的合成主要在神经末梢进行, 由胆碱和乙酰辅酶 A 在 ChAT 的催化下合成, ChAT 是 ACh 的合成酶, 在胆碱能神经元胞质内合成, 与 ACh 的分布几乎平行, 是胆碱能神经元的特殊标志。故常可以作为研究胆碱能神经元的标志或评估 ACh 含量的间接指标。大鼠的学习记忆过程伴有皮质和海马 ChAT 活性升高<sup>[13]</sup>。在人和动物的痴呆研究中, 很多结果都证实新皮质或海马的胆碱能通路功能降低与 AD 的学习和记忆能力丧失有密切关系<sup>[14,15]</sup>。本研究表明, DM 大鼠合并 CCH 使海马 ChAT 减少, 进而可导致 ACh 合成减少, 造成中枢胆碱能神经功能降低, 从而导致大鼠学习记忆能力减退。观察结果与行为学测试结果也是一致的。

本研究结果表明, DM 大鼠合并慢性脑缺血可引起空间学习记忆功能障碍, 可能与胆碱能神经功能障碍密切相关, 为治疗临床上 DM 合并慢性脑缺血导致的认知功能障碍患者提供了实验室依据。

## 参考文献

- [1] Ohta H, Nishikawa H, Kimura H, et al. Chronic cerebral hypoperfusion by permanent internal carotid ligation produces learning impairment without brain damage in rats[J]. *Neuroscience*, 1997, 79:1039-1050
- [2] Otori T, Katsumata T, Muramatsu H, et al. Long-term measurements of cerebral blood flow and metabolism in a rat chronic hypoperfusion model[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2003, 30:266-272
- [3] Tsuchiya M, Sako K, Yura S, et al. Cerebral blood flow and histopathological changes following permanent bilateral carotid

- artery ligation in Wistar rats[J]. *Exp Brain Res*, 1992, 89:87-92
- [4] Ulrich PT, Kroppenstedt S, Heimann A, et al. Laser-Doppler scanning of local cerebral blood flow and reserve capacity and testing of motor and memory functions in a chronic 2-vessel occlusion model in rats[J]. *Stroke*, 1998, 29:2412-2420
- [5] Clegg DJ, Gotoh K, Kemp C, et al. Consumption of a high-fat diet induces central insulin resistance independent of adiposity[J]. *Physiol Behav*, 2011, 103:10-16
- [6] Sharma B, Singh N. Behavioral and biochemical investigations to explore pharmacological potential of PPAR-gamma agonists in vascular dementia of diabetic rats[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2011, 100:320-329
- [7] Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, et al. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening[J]. *Pharmacol Res*, 2005, 52:313-320
- [8] Ni J, Ohta H, Matsumoto K, et al. Progressive cognitive impairment following chronic cerebral hypoperfusion induced by permanent occlusion of bilateral carotid arteries in rats[J]. *Brain Res*, 1994, 653:231-236
- [9] Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory[J]. *Nat Protoc*, 2006, 1:848-858
- [10] Valentim LM, Michalowski CB, Gottardo SP, et al. Effects of transient cerebral ischemia on glial fibrillary acidic protein phosphorylation and immunoreactivity in rat hippocampus[J]. *Neuroscience*, 1999, 91:1291-1297
- [11] Zhang T, Pan BS, Zhao B, et al. Exacerbation of poststroke dementia by type 2 diabetes is associated with synergistic increases of beta-secretase activation and beta-amyloid generation in rat brains[J]. *Neuroscience*, 2009, 161:1045-1056
- [12] Cechetti F, Pagnussat AS, Worm PV, et al. Chronic brain hypoperfusion causes early glial activation and neuronal death, and subsequent long-term memory impairment[J]. *Brain Res Bull*, 2012, 87:109-116
- [13] Perry E, Walker M, Grace J, et al. Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness[J]. *Trends Neurosci*, 1999, 22:273-80
- [14] Dudkin KN, Chueva IV, Makarov FN, et al. Alterations of the sensory and cognitive components of operative memory in a monkey model of Alzheimer's disease[J]. *Dokl Biol Sci*, 2003, 389:99-101
- [15] DeKosky ST, Ikonomic DM, Styren SD, et al. Upregulation of choline acetyltransferase activity in hippocampus and frontal cortex of elderly subjects with mild cognitive impairment[J]. *Ann Neurol*, 2002, 51:145-55

(2013-10-16 收稿 2013-10-21 修回)