

## 基础研究

## 胰高血糖素样多肽-1改善2型糖尿病大鼠的学习和记忆能力

谭照光<sup>1~3</sup>,高维鸿<sup>1~3</sup>,蔡祥胜<sup>1~3</sup>,王方<sup>4</sup>,惠宏襄<sup>1~3,5</sup>南方医科大学<sup>1</sup>生物技术学院,<sup>2</sup>国际病代谢中心,<sup>4</sup>神经生物教研室,广东 广州 510515;<sup>3</sup>东莞南方医大代谢医学研发有限公司,广东 东莞 523000;<sup>5</sup>美国加州大学洛杉矶医学院胰腺病中心,美国 加州 90095

**摘要:**目的 观察糖尿病治疗药物胰高血糖素样肽-1(GLP-1)对糖尿病大鼠学习与记忆功能障碍的改善作用。方法 雄性SD大鼠随机分为正常组(Normal),糖尿病模型组(DM)和GLP-1治疗组(GLP-1)。采用高脂高糖喂养合并链脲佐菌素(STZ)诱导建立2型糖尿病模型。将糖尿病大鼠模型随机分为糖尿病组和GLP-1组,糖尿病组大鼠不进行治疗,GLP-1组大鼠于糖尿病成型后第25天,以经皮下埋缓释泵方式给予GLP-1(30 pmol/kg/min)治疗7 d。治疗结束后先使用Morris水迷宫实验评估各组大鼠的学习及认知能力,然后或获取大鼠大脑海马区组织,用实时定量PCR(Real-time PCR)检测认知相关基因的转录,蛋白印迹法(Western blotting)检测认知相关蛋白的表达,免疫组化检测认知相关蛋白的表达和细胞定位。结果 Morris水迷宫实验显示糖尿病组大鼠的学习和记忆功能显著下降( $P<0.05$ ),荧光定量PCR结果发现糖尿病大鼠脑内APP,BACE1,Arc,ERK1/2,PKA,PKC的基因转录升高( $P<0.05$ ),Western Blotting和免疫组化结果显示 Arc蛋白分子在糖尿病大鼠中表达升高。而GLP-1处理组大鼠的学习和记忆功能比糖尿病组有显著改善( $P<0.05$ ),脑内APP,BACE1,Arc,ERK1/2,PKA,PKC基因转录表达明显减少( $P<0.05$ ),Arc表达降低。结论 GLP-1治疗能够显著改善2型糖尿病大鼠的学习与记忆功能障碍,其效果可能是通过调控细胞的PKC,PKA,ERK1/2通路,抑制Arc的表达而实现的。

**关键词:**胰高血糖素样多肽-1;糖尿病;学习与记忆功能障碍;Arc

## Glucagon-like peptide 1 improves learning and memory abilities of rats with type 2 diabetes

TAN Zhaoguang<sup>1,3</sup>, GAO Weihong<sup>1,3</sup>, CAI Xiangsheng<sup>1,3</sup>, WANG Fang<sup>4</sup>, HUI Hongxiang<sup>1,3,5</sup>

<sup>1</sup>School of Biotechnology, <sup>2</sup>International Center for Metabolic Diseases, <sup>4</sup>Department of Neurobiology, School of Basic Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; <sup>3</sup>Dongguan SMU Metabolic Medicine R&D Inc, Dongguan 523000, China; <sup>5</sup>UCLA Center for Excellence in Pancreatic Disease, David Geffen School of Medicine, University of California, Los Angeles, California 90095, USA

**Abstract: Objective** To investigate the effect of glucagon-like peptide 1 (GLP-1) on cognitive dysfunction in diabetic rats. **Methods** Male SD rats were randomly divided into normal control group, diabetes mellitus (DM) group, and GLP-1 treatment group. Rat models of type 2 diabetes were established by high-sugar and high-fat feeding and streptozotocin (STZ) injection, and 25 days after the onset of diabetes, GLP-1 was infused in GLP-1 treatment group at the rate of 30 pmol · kg<sup>-1</sup> · min<sup>-1</sup> via a subcutaneous osmotic pump for 7 days. The learning and cognitive ability of the rats was assessed with Morris water maze test, and the expression of cognition-related genes in the hippocampus tissue was detected with real-time PCR, Western blotting and immunohistochemical staining. **Results** Compared with the normal control group, the diabetic rats showed significantly decreased learning and memory abilities ( $P<0.05$ ) with increased hippocampal expressions of APP, BACE1, Arc, ERK1/2, PKA, and PKC mRNAs ( $P<0.05$ ) and Arc protein. Compared with diabetic rats, GLP-1-treated rats showed significant improvements in the learning and memory function ( $P<0.05$ ) with decreased expressions of APP, BACE1, Arc, ERK1/2, and PKA mRNAs ( $P<0.05$ ) and Arc protein. **Conclusion** GLP-1 can improve cognitive dysfunctions in diabetic rats possibly by regulating the PKC, PKA, and ERK1/2 pathways and inhibiting Arc expression in the hippocampus.

**Key word:** glucagon-like peptide 1; diabetes; cognitive dysfunction; Arc

收稿日期:2016-03-21

基金项目:国家973基金(2011CB504006);松山湖科技基金(2010B025, 2010B026);广东科技基金(2010B090400041);博士点基金(20104433110014)

Supported by National Key Basic Research Program (2011CB504006).

作者简介:谭照光,硕士研究生,E-mail: 466311897@qq.com

通信作者:惠宏襄,教授,E-mail: huihongxiang@yeah.net

全球糖尿病发病率正处于快速增长期,根据国际糖尿病联盟(IDF)最新的公布的第七版糖尿病数据显示,2015年全球糖尿病患者人数4.15亿,患病率8.8%。全球糖尿病患病率呈快速上升趋势,预计2040年糖尿病患者数将达6.42亿,患病率将上升至10.4%。中国糖尿病患者数2015年达1.096亿,居全球首位,预计到2040

年中国糖尿病患者数将达1.507亿<sup>[1]</sup>。糖尿病常引起严重并发症,除血管病变、视网膜病、肾病和外周神经病变等传统并发症外,近来糖尿病脑病也越来越引起人们的注意<sup>[2]</sup>。糖尿病脑病在临床表现为认知功能障碍、痴呆、精神性疾患等,并且其发病隐匿,不易察觉<sup>[3]</sup>。随着糖尿病研究的逐步深入,已经发现糖尿病与认知障碍之间有明显的相关性,是诱发AD(Alzheimer's Disease)的一个危险因素<sup>[4]</sup>。在成年糖尿病患者中,常常伴有一定学习和记忆功能障碍,并且阿尔茨海默病发病率的风险显著增高2~3倍<sup>[3]</sup>。糖尿病患者常伴发抑郁症,而抑郁症等不良情绪对糖尿病的代谢控制及转归有消极影响,因此控制糖尿病脑病对于糖尿病的治疗有重要的意义。目前用于改善学习与记忆功能的药物主要有他克林、卡巴拉汀、加兰他敏、多奈哌齐、美金刚等,它们主要通过以乙酰胆碱前体、乙酰胆碱酯酶抑制剂和选择性胆碱能受体激动剂的方式,暂时性缓解疾病症状,寻找能有效防治糖尿病脑病的药物具有非常重要的意义<sup>[5]</sup>。

胰高血糖素样肽-1(GLP-1)是由肠壁L-细胞分泌的激素,其作用包括刺激葡萄糖依赖性胰岛素分泌,促进胰岛素生物合成,降低血糖,保护胰岛B细胞,改善T2DM的症状<sup>[6]</sup>。此外,近年发现它还能促进神经细胞的增殖和神经发生,抑制神经细胞凋亡。例如,Gault报道<sup>[7]</sup>GLP-1不仅直接调节神经递质的释放和LTP(synaptic plasticity)的形成,而且能保护由 $\beta$ -淀粉样蛋白片段诱导的突触LTP损伤。目前认为GLP-1及其类似物的这种作用可能与其能保护脑细胞和增加脑血流量有关<sup>[8-9]</sup>,对于GLP-1对于脑部的保护作用的已经有一定研究<sup>[10-12]</sup>,但有关其保护的分子机理尚不清楚。

本研究通过GLP-1治疗糖尿病模型动物,观察GLP-1改善糖尿病引起的大鼠学习与记忆功能的损伤及其可能的机理。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 选取6~8周的SD雄性大鼠,体质量160~180 g 购买自南方医科大学动物实验中心,合格证号SCXK(粤)2011-0015。所有动物操作均依照制度动物保健和使用委员会的指导方针。

1.1.2 主要试剂 GLP-1自上海波肽生物公司合成(500 mg,纯度>95%),链脲佐菌素(STZ)购自sigma公司(批号S0130-1G)。抗Arc抗体购自santa cruz公司(sc-15325),抗 $\beta$ -actin抗体购自博世德公司(BM1623),羊抗兔二抗购自弗德生物公司(FDR007),荧光定量PCR试剂盒购自TAKARA公司(RR047A, RR820A),水合氯醛、甲醛购自广州金华大化学试剂有限公司,所有化学试剂均为分析纯度。

1.1.3 仪器 Applied Biosystems 7500 荧光定量PCR仪(美国ABI),安准血糖检测仪(长沙三诺生物传感技术有限公司),2001植入式胶囊渗透压缓释泵(美国Alzet公司),酶标仪(美国Biorad),水迷宫仪器购买自上海移数公司,鼠博士行为学软件用于水迷宫数据分析。

### 1.2 实验方法

1.2.1 分组和给药 雄性SD大鼠27只于实验前适应性喂养1周后,随机分为3组,每组9只。对照组大鼠常规饲料喂养,糖尿病大鼠参照沈亚非<sup>[13]</sup>等的方法制备糖尿病大鼠模型,采用高脂高糖饲料喂养,1个月后,大鼠腹腔注射链脲佐菌素40 mg/kg,3 d后监测血糖,连续2 d血糖均高于16.7 mmol/L认定为2型糖尿病。糖尿病大鼠喂养25 d后被随机分成模型组和GLP-1组,模型组糖尿病大鼠不做治疗处理。GLP-1组通过皮下手术包埋植入式渗透压泵灌注GLP-1(30 pmol/kg/min),连续给药7 d。

1.2.2 Morris 水迷宫 水迷宫实验参照Wang等<sup>[14]</sup>的方法。试验简述如下:水迷宫在一个直径160 cm的圆形黑色水池中进行,水温保持在25±2℃,一个12 cm直径透明圆形平台放置在水下2 cm。定位航行定在每天下午2点进行,连续5 d。实验时,已经提前1 h适应的大鼠被面朝池壁分4个象限放入水中,动物60 s内寻找到平台的时间记录为逃避潜伏期。在60 s内没有找到平台的大鼠,则用小木棍引导至平台,并让平台上停留15 s,让其记忆空间标记物,记录逃避潜伏期为60 s。成功在60 s内到达平台动物同样让其在平台休息15 s。试验结束。每只大鼠每次游泳时候的路线和逃避潜伏期都会被记录下来。

在定位航行实验完成后24 h,进行空间探索实验,我们把平台移除,让大鼠在原来平台对侧象限入水,在水池中游泳60 s,记录大鼠游泳的路线,计算通过原来平台的次数和在原来平台象限的时间百分比。

1.2.3 荧光定量PCR检测基因mRNA转录水平 荧光定量PCR检测基因mRNA转录水平:大鼠迅速断头后,头部沿着中线剪开皮肤,再剪刀向上挑着把颅骨剪开,到嗅区空洞处向左向右各剪1刀,然后用镊子把颅骨扒开,迅速把脑部放到冰冻的PBS中,用镊子分离大脑海马区组织。切碎研磨采集的大鼠海马区组织,提取各组总RNA,测定浓度,各取1  $\mu$ g总RNA用于RT-QPCR检测,引物序列如表1所示,检测方法参照试剂盒说明书。

1.2.4 Western blotting 自采集大鼠的海马组织中提取蛋白质。每100 mg大鼠大脑组织加入1 mL RIPA裂解液,充分研磨裂解,12 000 g离心15 min,将上清转移到干净无菌的离心管中,BCA法测定蛋白的浓度,用裂解液调整蛋白浓度一致,取20  $\mu$ L调整好蛋白浓度样品,加入5  $\mu$ L的5×还原性的SDS-PAGE上游缓冲液,混匀,

表1 大鼠来源引物序列  
Tab.1 Primer sequences from rats

| Name    | Forward primer (5'-3') | Reverse primer (5'-3') |
|---------|------------------------|------------------------|
| Arc     | CTGAGATGCTGGAGCACGTA   | GCCTTGATGGACTTCTTCCA   |
| APP     | GTGATCTACGAGCGCATGAA   | AGAAGGCATGAGAGCATCGT   |
| BACE1   | GCTGCAGTCAAGTCCATCAA   | ATTGCTGAGGAAGGATGGTG   |
| PKC     | TCCTTCACAACCAGGGCATC   | GGACTCCAAAGGACCACCAG   |
| PKA     | CTTGCCCCCGAGATTATCC    | GTTCCGAAGCAGGTCTCTCA   |
| PS1     | CAAGAGCTGCTGTCCAGGAA   | TGAAAATGGCGAGCAGGAGT   |
| ERK1    | CACTGGCTTTCTGACCGAGT   | ATGTGGTTGAGCTGGTCCAG   |
| ERK2    | GGTTGTTCCCAAACGCTGAC   | GTCGTCCAGCTCCATGTCAA   |
| B-actin | CAACACAGTGCTGTCTGGTG   | GATCCACATCTGCTGGAAG    |

沸水煮样品 10 min 使其变性。上胶 100 V 恒压 20 min, 下胶 180 V 50 min 的 SDS-PAGE(10%胶)电泳后, 200 mA 恒流 90 min 转膜, 把膜取出后置于 5% BSA 封闭 2 h, 之后把膜放置稀释后一抗中, 4 ℃ 孵育过夜。次日, 把膜用 TBST 洗 4 次后, 置于稀释后 2 抗中(1:5000), 摇床中室温孵育 1 h。把膜在 TBST 洗 4 次后, 在膜上加入 ECL 发光液发光, 最后在暗室中曝光显影条带。

1.2.5 免疫组化检测 Arc 在大鼠海马区表达变化及定位  
石蜡切片脱蜡至水:依次将切片放入二甲苯 I 15 min-二甲苯 II 15 min 无水乙醇 I 10 min-无水乙醇 II 10 min-95%酒精 5 min-90%酒精 5 min-80%酒精 5 min-70%酒精 5 min-蒸馏水洗。抗原修复:组织切片置于盛满 EDTA 抗原修复缓冲液(PH8.0)的修复盒中于微波炉内进行抗原修复。中火 8 min, 停火 8 min, 然后中低火 7 min, 此过程中应防止缓冲液过度蒸发, 切勿干片。自然冷却后将玻片置于 PBS(pH7.4)中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5 min。阻断内源性过氧化物酶:切片放入 3% 过氧化氢溶液, 室温避光孵育 25 min, 将玻片置于 PBS (PH7.4)中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5 min。加一抗:切片稍干后用组化笔在组织周围画圈(防止抗体流走), 在圈内滴加用 3% BSA 室温封闭 30 min, 甩掉 BSA 滴加按一定比例稀释好的一抗覆盖组织。切片平放于湿盒内 4 ℃ 孵育过夜。加二抗:玻片置于 PBS (pH7.4)中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5 min。切片稍干后在圈内滴加组化试剂盒内与一抗相应种属的二抗(HRP 标记)覆盖组织, 室温孵育 50 min。DAB 显色:玻片置于 PBS(PH7.4)中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5 min。切片稍干后在圈内滴加新鲜配制的 DAB 显色液, 显微镜下控制显色时间, 阳性为棕黄色, 自来水冲洗切片终止显色。复染细胞核:Harris 苏木素复染 3 min 左右, 自来水洗, 1%的盐酸酒精分化数秒, 自来水冲洗, 氨水返蓝, 流水冲洗。脱水封片:将切片依次放

入 70%酒精 5 min-80%酒精 5 min-90%酒精 5 min-95%酒精 5 min-无水乙醇 I 5 min-无水乙醇 II 5 min-二甲苯 I 5 min-二甲苯 II 5 min 中脱水透明, 将切片从二甲苯拿出来稍晾干, 中性树胶封片。

1.2.6 统计分析 应用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。水迷宫实验采用 two-way ANOVA, bonferroni 法对组别进行检验分析, 其他实验采用 one-way, bonferroni 法对组别进行检验分析, 以  $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 2 型糖尿病动物模型成功建立, 动物出现显著的糖尿病病症

在采用高糖高脂饲喂大鼠 4 周后腹腔注射链脲佐菌素, 注射链脲佐菌素 3 d 后, 连续空腹血糖检测达到  $25.8 \pm 3.1$  mmol/L(表 2), 高于糖尿病标准值 16.7 mmol/L, 连续空腹血糖检测, 其中显示血糖一直高于 16.7 mmol/L, 并且大鼠具有典型的多饮、多食、多尿、尿液混浊、消瘦等糖尿病病, 表明 2 型糖尿病大鼠模型制作成功。

2.2 GLP-1 治疗能显著改善糖尿病大鼠的学习与记忆功能

采用高糖高脂 STZ 诱导方法制备糖尿病动物模型后, 我们参照文献报道方法, 采用 Morris 水迷宫实验观察 3 组大鼠(正常大鼠、糖尿病大鼠、GLP-1 处理组大鼠)在水池内游泳并找到藏在水下逃避平台的能力, 判断 GLP-1 的保护作用。

(1)定位航行实验是用于测量大鼠学习和记忆能力的经典方法。如表 3 所示, 各组之间的潜伏期在前 2 d 没有观察到显著区别( $P > 0.05$ ), 但自第 3 天起, DM 组的潜伏期明显比 Normal 组潜伏期延长( $P < 0.05$ ), 该趋势持续到第 4 天和第 5 天, 显示 STZ 诱导的 DM 组大鼠的学习记忆功能自第 3 天后表现出明显受损。而同时接受 GLP-1 处理的糖尿病大鼠, 其第 3 天的潜伏期显著低于糖

表2 注射STZ后大鼠空腹血糖值

Tab.2 Fast blood glucose in rats after STZ injection (mmol/L, *Mean*±*SD*, *n*=9)

| Group  | Day 1    | Day 2    | Day 7    | Day 14   | Day 21   | Day 28   |
|--------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| DM     | 25.7±3.3 | 24.5±2.8 | 25.6±3.7 | 25.8±3.7 | 24.6±2.7 | 24.1±2.7 |
| Normal | 6.4±0.6  | 6.4±0.6  | 6.4±0.5  | 6.3±0.4  | 6.15±0.5 | 7.4±0.3  |

尿病组( $P<0.05$ ),与Normal组差异不显著( $P>0.05$ )。这种现象在第4天和第5天都持续观察到,说明GLP-1能减轻糖尿病对大鼠学习功能的破坏,保护大鼠的学习功

能(表3)。大鼠在定位航行实验中的游泳速度,各组游泳速度没有显著差异,说明动物自主运动能力没有差异(表4)。

表3 Morris水迷宫实验定向航行实验检测大鼠逃避潜伏期

Tab.3 Escape latency of rats in place navigation in Morris water maze test (s, *Mean*±*SD*, *n*=9)

| Group  | Day 1      | Day 2      | Day 3                   | Day 4                   | Day 5                   |
|--------|------------|------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Normal | 51.67±4.39 | 29.03±4.33 | 14.62±3.83              | 14.69±3.82              | 11.36±1.41              |
| DM     | 48.57±4.51 | 33.37±6.14 | 33.41±5.11 <sup>#</sup> | 33.33±5.35 <sup>#</sup> | 32.17±5.45 <sup>#</sup> |
| GLP-1  | 47.08±4.39 | 30.65±6.73 | 19.82±2.53*             | 22.42±4.46*             | 18.85±3.02*             |

<sup>#</sup> $P<0.05$  vs Normal group, \* $P<0.05$  vs DM group.

表4 Morris水迷宫实验定向航行实验大鼠游泳速

Tab.4 Velocity of swimming in place navigation in Morris water maze test (cm/s, *Mean*±*SD*, *n*=9)

| Group  | Day 1       | Day 2      | Day 3       | Day 4      | Day 5      |
|--------|-------------|------------|-------------|------------|------------|
| Normal | 23.29±5.36  | 22.25±4.29 | 17.42±4.06  | 18.29±4.89 | 17.54±2.46 |
| DM     | 21.65±5.24  | 20.20±5.23 | 18.967±3.86 | 20.88±4.38 | 20.90±3.98 |
| GLP-1  | 20.487±2.78 | 21.84±4.47 | 20.97±2.72  | 21.42±3.57 | 19.08±4.33 |

(2)空间探索实验用于测量大鼠在学会寻找平台后,对平台位置记忆的保持能力。定位航行实验结束后24 h,撤去平台,从原平台对面象限中央放入水中,记录其在水池中游泳轨迹,计算60 s内通过原平台的次数,以及原平台象限的保留时间。在本实验中,与Normal组穿过原平台次数相比,DM组次数显著减少,显示DM组的记忆功能损伤。而GLP-1组通过平台次数高于DM组,统计分析显示有显著性差别( $P<0.05$ ),基本接近Normal组水平( $P>0.05$ ),表5展示了各组大鼠在目标象限的时间百分比数字。统计分析显示DM组与正常对照组之间有显著性差异( $P<0.05$ ),说明糖尿病大鼠有明显的记忆能力障碍,而GLP-1处理组百分比显著好于DM组百分比( $P<0.05$ ),与Normal组接近( $P>0.05$ ),表明GLP-1能减轻糖尿病引起的记忆功能损伤。

2.3 GLP-1调节大鼠海马区中多个记忆相关基因mRNA的表达

取各组大鼠的大脑海马区组织,Real-time PCR方法分析记忆相关基因在大鼠大脑海马区mRNA的转录

水平,以进一步了解糖尿病大鼠脑损伤和GLP-1保护作用的分子机制。PKC,PKA和ERK1/2是细胞内与细胞增殖、分化和凋亡最密切的常见信号通路;Arc作为PKC,PKA,ERK1/2信号通路下游的分子,能够调控APP,PS1,BACE1等分子的表达和修饰,从而调控A $\beta$ 的产生<sup>[15]</sup>。与正常组相比,糖尿病大鼠大脑细胞内PKC,PKA,ERK1/2的表达均有增高( $P<0.05$ ),同时诱导Arc,APP,PS1,BACE1的表达升高( $P<0.05$ ),这些变化是引起糖尿病大鼠脑学习与记忆功能障碍的主要信号途径(表6)。而GLP-1处理能够抑制PKC,PKA和ERK1/2,以及其下游的Arc,APP,PS1,BACE1升高( $P<0.05$ )。表明GLP-1是通过抑制这条通路分子的表达来实现对脑细胞功能的保护。

#### 2.4 GLP-1抑制糖尿病大鼠海马区Arc的表达

为了在蛋白水平进一步证实ARC的作用,我们从各组大鼠大脑海马区组织提取蛋白,进行Western blotting实验。DM组的Arc表达显著高于Normal组,而GLP-1组ARC表达比DM组要低(图1)。这些结果

表5 穿越原平台次数(次)及停留原平台所在象限停留时间百分比

Tab.5 Number of crossing the original platform and time percentage in the target quadrant (*Mean*±*SD*, *n*=9)

| Group  | Times of crossing platform | Time in target quadrant (%) |
|--------|----------------------------|-----------------------------|
| Normal | 4.25±1.25                  | 29.66±7.38                  |
| DM     | 1.25±0.50 <sup>#</sup>     | 17.79±3.99 <sup>#</sup>     |
| GLP-1  | 3.50±0.57*                 | 30.13±3.50*                 |

<sup>#</sup>*P*<0.05 *vs* Normal group, \**P*<0.05 *vs* DM group.

表6 荧光定量PCR检测大鼠海马区中mRNA表达RQ

Tab.6 Relative mRNA expressions of genes related with cognitive function in the hippocampus of the rats (*Mean*±*SD*)

| Gene  | Normal    | DM                       | GLP-1      |
|-------|-----------|--------------------------|------------|
| PKC   | 1.00±0.25 | 3.51±0.28 <sup>#</sup>   | 1.02±0.13* |
| PKA   | 1.00±0.25 | 8.92±0.39 <sup>#</sup>   | 5.05±1.71* |
| ERK1  | 1.00±0.24 | 4.89±1.79 <sup>#</sup>   | 2.15±0.13* |
| ERK2  | 1.00±0.34 | 6.18±0.52 <sup>#</sup>   | 3.05±0.16* |
| APP   | 1.00±0.10 | 5.44±0.96 <sup>#</sup>   | 0.47±0.05* |
| Arc   | 1.00±0.13 | 13.36±1.25 <sup>#</sup>  | 2.71±0.47* |
| BACE1 | 1.00±0.08 | 7.60±0.95 <sup>#</sup>   | 0.63±0.09* |
| PS1   | 1.00±0.27 | 11.09±0.914 <sup>#</sup> | 1.63±0.64* |

<sup>#</sup>*P*<0.05 *vs* Normal group, \**P*<0.05 *vs* DM group.

同PCR结果相吻合,即ARC在糖尿病大鼠海马区表达增高,GLP-1处理后糖尿病大鼠海马区ARC的表达下降。

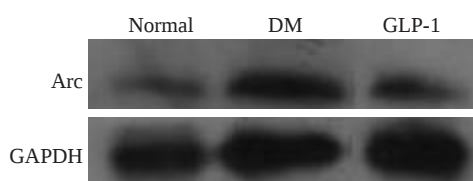


图1 WB检测Arc在各组大鼠海马区表达

Fig.1 Detection of Arc expression in the hippocampus of the rats by Western blotting.

## 2.5 免疫组化检测Arc在大鼠海马区表达变化及定位

Arc为神经突触后蛋白, Arc的变化与AD的发生有密切联系。我们采用免疫组化方法进一步证实ARC的变化和作用。图2中表明Arc蛋白在大鼠海马区的表达位置及含量。图中蓝色染色为海马区细胞,黄褐色为Arc在细胞中的蛋白表达位置。在正常组细胞中几乎观察不到明显黄褐色的Arc表达,而DM组中细胞膜的上黄褐色明显增多,显示ARC蛋白表达增多。与DM组相比,GLP-1组中细胞膜的黄褐色有所下降。该结果同上述的PCR和蛋白印迹方法相互吻合,表明ARC是影响脑细胞功能的重要分子,GLP-1可能是通过抑制

糖尿病诱导的ARC过高表达,达到保护大鼠学习与记忆功能的作用。

## 3 讨论

本研究通过GLP-1治疗糖尿病模型动物,定量分析了糖尿病大鼠的认知障碍和GLP-1对其保护作用。结果显示GLP-1治疗能够改善2型糖尿病的学习与记忆功能障碍,其效果可能是通过调控细胞的PKC,PKA, ERK1/2通路,抑制Arc的表达而实现的。

研究GLP-1对大脑的保护作用是近年来新出现的研究动态,报道不多,且各研究组在模型选择和观察指标上也不尽统一。Han等<sup>[11]</sup>使用向啮齿动物脑室内注射注射Aβ(4 μL, 4 nmoL)的方式诱导脑损伤模型,并采用脑室内注射GLP-1类似物利拉鲁肽的方法观察GLP-1的作用,这种方式同糖尿病自然状态有显著差异。在本研究中我们采用高脂高糖链脲佐菌素诱导了2型糖尿病大鼠模型,这是糖尿病研究最为广泛使用的动物模型,并选用经典Morris水迷宫实验评价了大鼠的学习和记忆功能,然后采用空间探索实验观察了大鼠的记忆能力。结果显示DM组大鼠的学习记忆功能表现出明显受损,而GLP-1能减轻糖尿病对大鼠学习功能的破坏,保护糖尿病大鼠的学习功能。空间探索实验发现DM组通过原平台次数显著少于正常组,而GLP-1组通

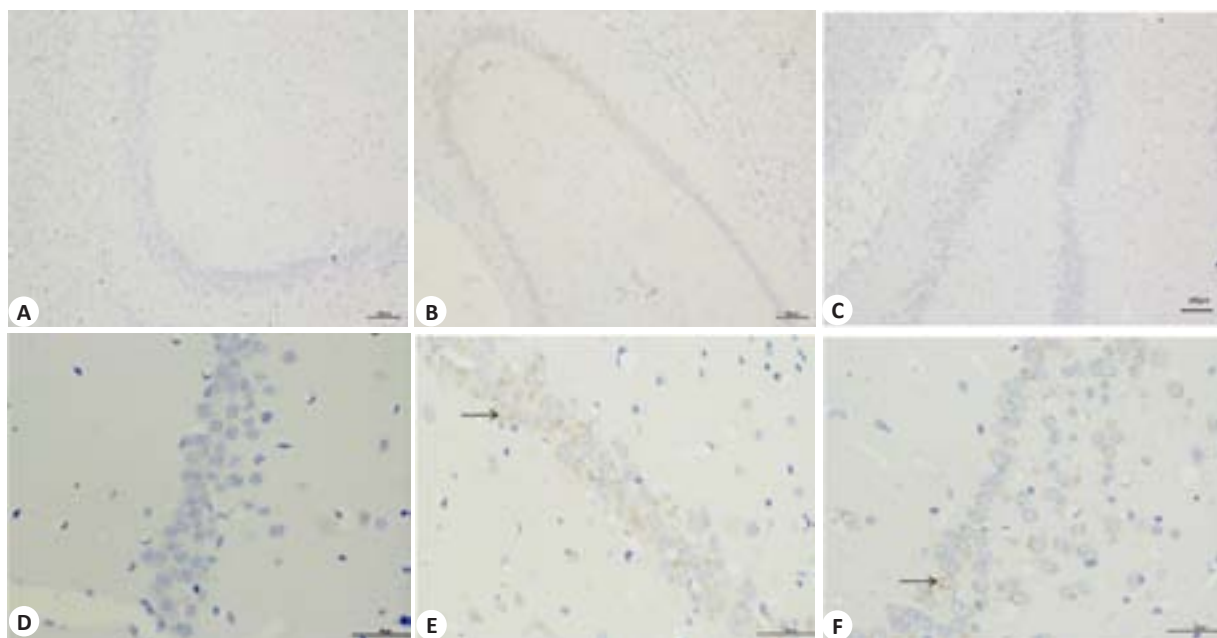


图2 免疫组化检测Arc在大鼠海马区表达变化及定位

Fig.2 Immunohistochemistry of Arc expression in the hippocampus of the rats in different groups (A, B, C: original magnification:  $\times 100$ ; D, E, F:  $\times 400$ ). A, D: Normal group; B, E: DM group; C, F: GLP-1 group.

过平台次数基本接近Normal组水平,说明糖尿病影响了大鼠的记忆能力,GLP-1能减轻糖尿病引起的记忆功能损伤。在本实验中,我们观察到高糖高脂STZ诱导的2型糖尿病大鼠在发病4周后即可出现的学习与记忆功能障碍,大大早于Wang等<sup>[16]</sup>报道的糖尿病大鼠发病4个月后才出现学习与记忆功能障碍的时间节点。我们首次发现GLP-1对高脂高糖链脲佐菌素诱导2型糖尿病引起的学习与记忆功能障碍有改善作用,这与Bromfim等采用GLP-1类似物艾塞那肽在APP/PS1突变鼠中的观察的学习与记忆功能障碍改善现象类似<sup>[10]</sup>,证明GLP-1也是保护糖尿病脑功能的有效药物。

为了进一步搞清楚GLP-1是如何保护大脑组织的,我们观察了大脑细胞中相关基因的表达,以期勾画出GLP-1作用的信号转导途径。PKC、PKA、ERK1/2是细胞内与细胞增殖、分化和凋亡最密切的常见信号通路,已经有报道指出PKC、PKA、ERK1/2在糖尿病中会被激活,参与一系列的信号通路变化<sup>[17-19]</sup>。有报道认为糖尿病大鼠在会出现A $\beta$ 累积,海马萎缩,神经突触丢失等AD样病理变化<sup>[16]</sup>。Arc是一种可塑性蛋白,其参与着学习和记忆的进行,有研究发现,Arc在A $\beta$ 的产生中起着重要作用<sup>[20-22]</sup>,在AD模型大鼠中,信号通路PKA、PKC、ERK激活Arc的表达,能引起A $\beta$ 的升高<sup>[18]</sup>。有研究认为GLP-1类似物的保护作用可能是通过调节JNK-IRS1通路<sup>[10]</sup>,或Camp-PKC通路发生作用<sup>[41]</sup>,但尚无法把GLP-1通路与A $\beta$ 累积等病理改变联系起来。在神经细胞中,APP通过 $\beta$ 分泌酶BACE1和 $\gamma$ 分泌酶PS1的连续的剪切最终产生A $\beta$ <sup>[23-24]</sup>,当这种有神经毒性的物

质出现堆积时,会引起神经系统的病理学变化<sup>[15, 23, 25]</sup>。本实验系统观察了糖尿病大鼠大脑海马区PKA、PKC、ERK、APP、BACE1、Arc、PS1 mRNA水平上的变化,发现糖尿病大鼠(DM)的PS1、PKC、PKA、ERK1/2、BACE1、APP、Arc基因比正常组(Normal)表达增高( $P < 0.05$ ),完善了糖尿病脑学习与记忆功能损伤的分子机制。本研究还观察到GLP-1组中PS1、PKC、PKA、ERK1/2、BACE1、APP、Arc的mRNA水平比DM组中转录要低( $P < 0.05$ ),提示GLP-1正是通过抑制高糖高脂STZ诱导的该信号通路激活,而达到保护脑学习与记忆功能的作用。本结果大大细化了此前有关GLP-1在中枢神经系统中调节PKA、PKC等信号分子变化<sup>[26]</sup>,更清楚地勾画出GLP-1的信号转导通路。

#### 参考文献:

- [1] Medscape. IDF Atlas: about 415 million adults worldwide have diabetes[Z], 2015.
- [2] Strachan MW, Frier BM, Deary IJ. Type 2 diabetes and cognitive impairment[J]. Diabet Med, 2003, 20(1): 1-2.
- [3] Velayudhan L, Poppe M, Archer N, et al. Risk of developing dementia in People with diabetes and mild cognitive impairment[J]. Br J Psychiatry, 2010, 196(1): 36-40.
- [4] Zhou H, Lu W, Shi Y, et al. Impairments in cognition and resting-state connectivity of the hippocampus in elderly subjects with type 2 diabetes[J]. Neurosci Lett, 2010, 473(1): 5-10.
- [5] Sebastiao I, Candeias E, Santos MS, et al. Insulin as a bridge between type 2 diabetes and alzheimer Disease-How Anti-Diabetics could be a solution for Dementia[J]. Front Endocrinol(Lausanne), 2014, 5: 110.

- [6] Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes[J]. *Lancet*, 2006, 368(9548): 1696-705.
- [7] Gault VA, Holscher C. GLP-1 agonists facilitate hippocampal LTP and reverse the impairment of LTP induced by beta-amyloid[J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 587(1-3): 112-7.
- [8] Holscher C. Incretin analogues that have been developed to treat type 2 diabetes hold promise as a novel treatment strategy for Alzheimer's disease[J]. *Recent Pat CNS Drug Discov*, 2010, 5(2): 109-17.
- [9] Egebjerg L, Gejl M, Møller A, et al. Effects of liraglutide on neurodegeneration, blood flow and cognition in Alzheimer's disease protocol for a controlled, randomized double-blinded trial[J]. *Dan Med J*, 2012, 59(10): A4519.
- [10] Bomfim TR, Fornry-Germano L, Sathler LB, et al. An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease-associated A $\beta$  oligomers[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(4): 1339-53.
- [11] Han WN, Holscher C, Yuan L, et al. Liraglutide protects against amyloid- $\beta$  protein-induced impairment of spatial learning and memory in rats[J]. *Neurobiol Aging*, 2013, 34(2): 576-88.
- [12] Xu W, Yang Y, Yuan G, et al. Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, reduces Alzheimer disease-associated tau hyperphosphorylation in the hippocampus of rats with type 2 diabetes[J]. *J Invest Med*, 2015, 63(2): 267-72.
- [13] 沈亚非, 徐焱成. 高糖高脂膳食和链脲佐菌素诱导2型糖尿病模型的建立[J]. *实用诊断与治疗杂志*, 2006, 20(9): 649-50.
- [14] Wang X, Wang LP, Tang H, et al. Acetyl-L-carnitine rescues scopolamine-induced memory deficits by restoring insulin-like growth factor II via decreasing p53 oxidation [J]. *Neuropharmacology*, 2014, 76(PtA): 80-7.
- [15] Cheng X, Wu J, Geng M, et al. Role of synaptic activity in the regulation of amyloid beta levels in Alzheimer's disease [J]. *Neurobiol Aging*, 2014, 35(6): 1217-32.
- [16] Wang QJ, Yin J, Song YF, et al. Brain aging and AD-like pathology in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *J Diabetes Res*, 2014, 2014: 796840.
- [17] Yoshino Y, Ishisaka M, Tsujii S, et al. Glucagon-like peptide-1 protects the murine hippocampus against stressors via Akt and ERK1/2 signaling[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 458(2): 274-9.
- [18] Du LL, Xie JZ, Cheng XS, et al. Activation of sirtuin 1 attenuates cerebral ventricular streptozotocin-induced tau hyperphosphorylation and cognitive injuries in rat hippocampi [J]. *Age (Dordr)*, 2014, 36(2): 613-23.
- [19] Jolivalt CG, Hurford R, Lee CA, et al. Type 1 diabetes exaggerates features of Alzheimer's disease in APP transgenic mice [J]. *Exp Neurol*, 2010, 223(2): 422-31.
- [20] Lyford GL, Yamagata K, Kaufmann WE, et al. Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites[J]. *Neuron*, 1995, 14(2): 433-45.
- [21] Wallace CS, Lyford GL, Worley PF, et al. Differential intracellular sorting of immediate early gene mRNAs depends on signals in the mRNA sequence[J]. *J Neurosci*, 1998, 18(1): 26-35.
- [22] Steward O, Worley PF. Selective targeting of newly synthesized Arc mRNA to active synapses requires NMDA receptor activation [J]. *Neuron*, 2001, 30(1): 227-40.
- [23] Pedrós I, Petrov D, Allgaier M, et al. Early alterations in energy metabolism in the hippocampus of APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1842(9): 1556-66.
- [24] Roshan R, Ghosh T, Gadgil M, et al. Regulation of BACE1 by miR-29a/b in a cellular model of Spinocerebellar Ataxia 17 [J]. *RNA Biol*, 2012, 9(6): 891-9.
- [25] De Strooper B, Annaert W. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein[J]. *J Cell Sci*, 2000, 113(Pt 11): 1857-70.
- [26] Li Y, Duffy KB, Ottinger MA, et al. GLP-1 receptor stimulation reduces amyloid-beta peptide accumulation and cytotoxicity in cellular and animal models of Alzheimer's disease[J]. *J Alzheimers Dis*, 2010, 19(4): 1205-19.

(编辑: 经 媛)