

◇ 药学研究 ◇

丁苯酞对 db/db 小鼠学习记忆及海马 NR2B 受体的影响

王海芳¹, 张钢¹, 张彦春², 董运强³, 赵娜¹, 兰敏¹, 冀素晓¹, 张松筠⁴

(1. 邯郸市第一医院内分泌一科, 河北 邯郸 056000; 2. 邯郸市中心医院分院内分泌科, 河北 邯郸 056000; 3. 邯郸市疾病预防控制中心, 河北 邯郸 056000; 4. 河北医科大学第二医院内分泌科, 河北 石家庄 050000)

摘要:目的 观察丁苯酞对 2 型糖尿病 db/db 小鼠学习记忆及海马 N-甲基-D-天冬氨酸受体 2B 亚基(NR2B)表达的影响, 探讨丁苯酞改善糖尿病认知功能障碍的机制。方法 将 16 只 db/db 小鼠按随机数字表法分为丁苯酞干预组(L-NBP 组, $n=8$)和糖尿病对照组(DM 组, $n=8$), 同窝出生的 db/m 小鼠作为正常对照组(NC 组, $n=10$)。适应性喂养 1 周后, L-NBP 组每日以溶于植物油中的丁苯酞灌胃, 剂量为 $120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, DM 组与 NC 组则给予同等剂量的植物油灌胃, 干预 6 周后, 进行指标观察。应用 Morris 水迷宫检测小鼠的学习记忆能力。实时荧光定量 PCR 检测 NR2B mRNA 的表达情况。结果 与 NC 组比较, DM 组小鼠逃避潜伏期延长和平均探索次数减少($P < 0.05$), 而 L-NBP 组小鼠较 DM 组上述学习记忆成绩明显改善($P < 0.05$); 与 NC 组相比, DM 组和 L-NBP 组小鼠海马 CA1 区 NR2B mRNA 表达水平明显下降($P < 0.05$), 而 L-NBP 组较 DM 组 NR2B mRNA 表达水平明显增高($P < 0.05$)。结论 丁苯酞可改善糖尿病引发的认知功能障碍, 推测其机制可能与上调海马 NR2B 的表达有关。

关键词: 丁苯酞; 糖尿病; 认知功能障碍; db/db 小鼠; N-甲基-D-天冬氨酸受体 2B 亚基

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.12.004

Effect of L-3-n-butylphthalide on learning, memory and expression of NR2B receptors in hippocampus of db/db mice

WANG Haifang¹, ZHANG Gang¹, ZHANG Yanchun²,DONG Yunqiang³, ZHAO Na¹, LAN Min¹, JI Suxiao¹, ZHANG Songyun⁴

(1. Department of Endocrinology, The First Hospital of Handan, Handan, Hebei 056000, China;

2. Department of Endocrinology, Department of Handan Central Hospital, Handan, Hebei 056000, China;

3. Handan Municipal Center for Disease Control and Prevention, Handan, Hebei 056000, China;

4. Department of Endocrinology, Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050000, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of L-3-n-butylphthalide (L-NBP) on learning, memory and expression of N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptor NR2B subunit of db/db mice and its possible mechanism. **Methods** Sixteen diabetic db/db mice were randomly assigned into two groups by random number table: L-NBP group ($n=8$) and DM group ($n=8$). Littermate db/m mice (NC group, $n=10$) were used as normal control. After one week of adaptive feeding the mice in L-NBP group were given L-NBP dissolved in vegetable oil by oral gavage once a day at a dose of $120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ body weight, while DM and NC groups were both treated with equal amount of vegetable oil for 6 weeks. After 6 weeks of intervention, all the indexes were observed. The learning and memory ability of the mice was detected by Morris water maze test. The expression of NR2B mRNA was detected by realtime polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** The escaping latency time(s) was longer and the average number of cross platform exploration was less in DM group than in NC group ($P < 0.05$). The learning and memory scores were significantly higher in L-NBP group than in DM group ($P < 0.05$). The expression levels of NR2B mRNA in hippocampal CA1 area were significantly lower in DM and L-NBP groups than in NC group ($P < 0.05$). As compared with the mice in DM group, the expression levels of NR2B mRNA in hippocampal area were significantly higher in L-NBP group ($P < 0.05$). **Conclusions** L-NBP can improve the learning and memory of db/db mice by up-regulating the expression of NR2B in hippocampal CA1 area.

Key words: L-NBP; Diabetes mellitus; Cognitive dysfunction; db/db mice; N-methyl-D-aspartate receptor 2B subunit

基金项目: 邯郸市科学技术研究与发展计划项目(1623208064)

通信作者: 张松筠, 女, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 内分泌与代谢病, E-mail: zhangsongyun2016@126.com

糖尿病作为一种慢性代谢性疾病,可引起一系列的神经损伤及认知功能紊乱,形成糖尿病脑病^[1]。其主要的临床表现为认知功能下降^[2],如学习、记忆能力下降,最终可发展为痴呆。一项基于6 370例老年糖尿病患者的研究显示,糖尿病有近似双重的风险转化为痴呆^[3]。但具体机制尚不清楚,亦无有效的治疗药物。N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体为广泛分布于中枢神经系统的兴奋性谷氨酸离子通道受体,与学习记忆密切相关^[4]。其中,N-甲基-D-天冬氨酸受体 2B 亚基(NR2B)蛋白为 NMDA 受体的重要组成部分,在突触可塑性及学习记忆的形成中扮演着重要角色。丁苯酞是一种神经保护性药物,研究表明,其对糖尿病引起的认知障碍有着明显的预防及治疗作用^[5]。

1 材料与方法

1.1 试验材料 6 周龄清洁级雄性 db/db 小鼠 16 只,由北京大学医学部(实验动物科学部)提供。采用随机数学表法分为糖尿病对照组(DM 组, $n=8$)和丁苯酞干预组(L-NBP 组, $n=8$),同窝出生的 db/m 小鼠作为正常对照组(NC 组, $n=10$)。适应性喂养 1 周后,L-NBP 组每日以溶于植物油中的丁苯酞(石药集团恩必普药业有限公司) $120\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃,NC 组和 DM 组则给予同等剂量的植物油安慰剂,共 6 周。期间自由摄取食物和饮水。药物干预结束后进行血糖、体质量等相关指标观察。

1.2 试验方法

1.2.1 小鼠学习和记忆能力测试 采用 Morris 水迷宫实验进行认知能力检测:(1)定位航行实验:将小鼠头朝池壁放入水池中,记录 60 s 内小鼠从入水到爬上平台所需的时间,即为逃避潜伏期,以此作为空间学习能力的检测,如果 60 s 内未找到平台,则自动记录逃避潜伏期为 60 s,计算机停止跟踪,实验者将其引导至平台上,进行 10 s 停留,间隔 20 min 后,开始下一个象限,实验共进行 5 d;(2)空间探索试验:实验第 6 天,撤去平台,将小鼠从第二象限入水点放入水中,记录 60 s 内经过平台象限的次数,以此作为空间记忆功能的检测。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 检测海马组织 NR2B mRNA 的表达 水迷宫实验结束后进行试验取材,迅速将小鼠头部剪下,放于冰台上,选枕骨大孔处剪断枕骨和顶骨,打开颅骨,取出完整脑组织放于冰台上,为完整分离左右侧大脑皮层,使用镊子沿正中线行钝性分离,迅速剥离出双侧海马(此过程需在 3 min 内完成),放至 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的超低温冰箱中保存,取海马组织 100 mg,用 Trizol(美国 Invitrogen

公司)提取海马组织总 RNA(过程按说明书进行)。引物(美国 Invitrogen 公司)序列为:上游引物 5'-AGCCCGACTAATTCCAAGGC-3';下游引物为:5'-ATCGGCCCTTGTCTTTTCAGG-3'。PCR 热循环参数为 $48\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 s; $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s,共 40 个共循环。荧光信号监测点选在 $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应后,反应结束后获取循环阈值(CT 值),用 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司),采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法进行数据的相对定量分析。

1.3 统计学方法 所有数据采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计。观测数据均为计量资料,以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组间的比较采用单因素方差分析,两两比较应用 q 检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠血糖及体质量的比较 与 NC 组相比,DM 组和 L-NBP 组小鼠血糖及体质量均明显增高,差异有统计学意义($P<0.05$)。而 DM 组与 L-NBP 组间血糖及体质量比较均差异无统计学意义($P>0.05$)。具体数据见表 1。

表 1 各组小鼠的血糖及体质量比较/ $\bar{x}\pm s$			
组别	鼠数/只	血糖/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	体质量/g
NC 组	10	7.85 ± 1.21	25.60 ± 2.10
DM 组	8	22.60 ± 1.82^a	50.00 ± 3.58^a
L-NBP 组	8	22.25 ± 1.78^{ab}	51.40 ± 4.43^{ab}
方差分析	F 值	255.056	168.564
	P 值	0.000	0.000

注:与 NC 组比较,^a $P<0.05$;与 DM 组比较,^b $P>0.05$ 。

2.2 小鼠学习和记忆能力测试结果 与 NC 组相比,DM 组小鼠表现出明显的学习记忆功能受损,即逃避潜伏期明显延长及穿越平台次数明显减少,差异有统计学意义($P<0.05$),而应用丁苯酞治疗的 L-NBP 组小鼠学习记忆能力明显改善,与 DM 组相比,逃避潜伏期缩短及穿越平台次数增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。具体数据见表 2。

表 2 各组小鼠水迷宫实验的学习记忆成绩比较/ $\bar{x}\pm s$			
组别	鼠数/只	逃避潜伏期/ s	穿越平台次数/ (次/分钟)
NC 组	10	26.44 ± 5.76	6.88 ± 1.25
DM 组	8	51.53 ± 7.33^a	2.25 ± 1.04^a
L-NBP 组	8	37.38 ± 7.22^{ab}	4.75 ± 0.89^{ab}
方差分析	F 值	30.959	40.404
	P 值	0.000	0.000

注:与 NC 组比较,^a $P<0.05$;与 DM 组比较,^b $P<0.05$ 。

2.3 各组小鼠海马 CA1 区 NR2B mRNA 表达水平比较 NC 组、DM 组、L-NBP 组的 NR2B mRNA 表达水平分别为 (1.86 ± 0.14) 、 (1.02 ± 0.12) 、 (1.42 ± 0.12) , 差异有统计学意义 ($F = 33.662, P < 0.05$)。DM 组 NR2B mRNA 表达水平低于 NC 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。L-NBP 组 NR2B mRNA 表达水平高于 DM 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

糖尿病脑病作为糖尿病的一种慢性并发症, 发病率正在逐年增加。然而, 目前发病机制仍不明确。大量研究结果表明, 2 型糖尿病 db/db 小鼠以认知功能损伤为主要特点, 因此被视为研究糖尿病脑病的理想动物模型^[6-7]。本研究结果发现, db/db 小鼠于 13 周龄时表现出明显的学习记忆障碍, 同时检测其海马组织中 NR2B 的表达量减少。因此, 推测 NR2B 的低表达可能为糖尿病脑病发病的分子生物学机制之一。丁苯酞可改善小鼠的认知功能障碍, 并增加海马 CA1 区 NR2B 的表达。因此, 可以得出丁苯酞可能通过上调海马区 NR2B 的表达, 进而改善了小鼠的认知功能障碍。

学习记忆与神经突触传递效能的变化是相关的^[8]。突触传递的长时程增强 (LTP) 为评估突触可塑性的功能指标, 同时也被认为是研究脊椎动物学习记忆细胞基础的理想实验模型^[9]。其中, NMDA 受体作为突触长时程增强效应的“触发器”, 在神经系统的发育及学习记忆的形成中扮演着重要的角色。NR2B 为 NMDA 受体的主要调节亚单位, 因其能增强空间学习记忆能力, 故又被之称为“聪明基因”。研究表明, NR2B 的低表达与糖尿病认知障碍密切相关, Delibas 等^[10-11] 提出, 8 周龄的糖尿病大鼠, 检测其 NR2B 蛋白浓度约降低 30%, 并伴有学习记忆能力的下降。但这仅局限于 1 型糖尿病动物模型的研究, 对 2 型糖尿病有关 NR2B 机制的研究罕见国内外文献报道。本实验得出糖尿病组小鼠海马神经元 NR2B 表达减少, 与以上研究结果相一致, 说明糖尿病引起的空间学习记忆障碍与 NR2B 表达下调有着明显的关系。

丁苯酞为从中国芹菜种子中提取的纯化学组分, 可用于脑梗死急性期的患者, 其具有改善脑部微循环、缩小脑梗死面积、抗血小板聚集等神经保护作用^[12]。最近, 有研究显示^[13], 丁苯酞通过增强海马 LTP 从而改善慢性脑缺血大鼠的学习记忆障碍, 丁苯酞对缺血性脑血管病患者及动物模型有着积极的影响, 但关于丁苯酞对糖尿病脑病影响的报

道甚少。本研究发现, 与 DM 组相比, L-NBP 组小鼠学习记忆成绩明显提高, 同时检测其海马 CA1 区 NR2B 表达水平也是增加的。推测丁苯酞可能通过上调 NR2B 的表达, 增强海马突触可塑性, 进而改善了糖尿病小鼠的空间学习记忆障碍, 为糖尿病认知障碍的预防及治疗提供理论依据。

综上所述, 糖尿病认知障碍的发病机制与多种因素相关, 如脑部能量代谢的改变^[14]、炎症^[15]、氧化应激^[16]等, 目前本研究仅从突触可塑性方面分析, 未较全面的阐述糖尿病认知障碍的具体发病机制, 这也是我们进一步努力的方向。

参考文献

- [1] SASAKI-HAMADA S, TAMAKI K, OTSUKA H, et al. Chotosan, a Kampo formula, ameliorates hippocampal LTD and cognitive deficits in juvenile-onset diabetes rats[J]. J Pharmacol Sci, 2014, 124(2):192-200.
- [2] 李姝婷, 方群慧, 张楠, 等. 2 型糖尿病患者轻度认知障碍的危险因素分析[J]. 安徽医药, 2015, 19(4):690-693.
- [3] MAO XY, CAO DF, LI X, et al. Huperzine A ameliorates cognitive deficits in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(5):7667-7683.
- [4] MIKICS E, TOTTH M, BIRO L, et al. The role of GluN2B-containing NMDA receptors in short- and long-term fear recall[J]. Physiol Behav, 2017, 177:7667-7683.
- [5] LI J, ZHANG S, ZHANG L, et al. Effects of L-3-n-butylphthalide on cognitive dysfunction and NR2B expression in hippocampus of streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats[J]. Cell Biochem Biophys, 2015, 71(1):315-322.
- [6] WANG H, CHEN F, ZHONG KL, et al. PPAR γ agonists regulate bidirectional transport of amyloid- β across the blood-brain barrier and hippocampus plasticity in db/db mice[J]. Br J Pharmacol, 2016, 173(2):372-385.
- [7] RAMOS-RODRIGUEZ JJ, ORTIZ O, JIMENEZ-PALOMARES M, et al. Differential central pathology and cognitive impairment in pre-diabetic and diabetic mice[J]. Psychoneuroendocrinology, 2013, 38(11):2462-2475.
- [8] POSTNIKOVA TY, ZUBAREVA OE, KOVALENKO AA, et al. Status epilepticus impairs synaptic plasticity in rat hippocampus and is followed by changes in expression of NMDA receptors[J]. Biochemistry Mosc, 2017, 82(3):282-290.
- [9] MILADI-GORJI H, RASHIDY-POUR A, FATHOLLAHI Y, et al. Effects of voluntary exercise on hippocampal long-term potentiation in morphine-dependent rats[J]. Neuroscience, 2014(256):83-90.
- [10] DELIBAS N, ALTINTAS I, SUTCU K, et al. Effects of dietary long chain PUFAs on hippocampal lipid peroxidation and NMDA receptor subunits A and B concentration in streptozotocin-diabetic rats[J]. Int J Neurosci, 2004, 114(10):1353-1364.
- [11] DELIBAS N, KILINC I, YONDEN Z, et al. NMDA receptor subunits 2A and 2B decrease and lipid peroxidation increase in the hippocampus of streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin and gliclazide treatments[J]. Int J Neurosci, 2004, 114(3):391-401.