

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.08.003
文章编号: 1005-8982 (2019) 08-0014-04

高压氧对糖尿病大鼠认知功能 及 NGF mRNA 表达的影响

王风波, 魏晓霏, 王科, 唐明薇

(成都医学院第一附属医院 康复医学科, 四川 成都 610500)

摘要: 目的 探讨高压氧疗法对 2 型糖尿病 (T2DM) 大鼠认知功能及脑组织神经生长因子 microRNA (NGF mRNA) 表达的影响。**方法** 将 48 只成年健康 SD 大鼠按随机数字表法分为空白对照组 (12 只)、T2DM 模型组 (36 只)。模型复制成功后, T2DM 模型组大鼠再次按随机数字表法分为非干预 A 组 (6 只)、非干预 B 组 (12 只), 以及高压氧 A 组 (6 只)、高压氧 B 组 (12 只)。10 d 后采用 Morris 水迷宫实验检测非干预 A 组、高压氧 A 组认知功能, 空白对照组、非干预 B 组、高压氧 B 组随机选取 6 只大鼠脑组织检测 NGF mRNA。高压氧 A、B 组于注射 15 d 后开始高压氧干预, 1 次/d, 20 d 后各组再次分别检测认知功能及 NGF mRNA。**结果** 与非干预 A 组比较, 高压氧 A 组逃避潜伏期缩短 ($P < 0.05$), 穿越虚拟平台次数增多 ($P < 0.05$); 与非干预 B 组比较, 高压氧 B 组脑组织 NGF mRNA 表达水平升高 ($P < 0.05$)。**结论** 高压氧治疗可显著改善 T2DM 大鼠认知功能, 提升脑组织 NGF mRNA 表达水平, 提示高压氧治疗可有效改善早期 T2DM 患者认知功能, 其机制可能与高压氧增强脑组织 NGF mRNA 表达有关。

关键词: 糖尿病, 2 型; 高压氧; 认知; 神经生长因子; microRNAs

中图分类号: R587.1

文献标识码: A

Effects of hyperbaric oxygen therapy on cognitive function and nerve growth factor mRNA expression of diabetes rats

Feng-bo Wang, Xiao-fei Wei, Ke Wang, Ming-wei Tang

(Department of Rehabilitation Medicine, the First Affiliated Hospital of Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan 610500, China)

Abstract: Objective To explore the effects of hyperbaric oxygen therapy on cognitive function and expression of nerve growth factor mRNA (NGF mRNA) in brain tissue of type 2 diabetes mellitus (T2DM) rats. **Methods** Totally 48 healthy adult SD rats were randomly divided into two groups: blank control group ($n = 12$) and T2DM model group ($n = 36$). After 4 weeks of a high-sugar high-fat diet, the rats in T2DM model group were intraperitoneally injected with streptozotocin (35mg/kg) only once. Three days later, the random blood glucose (RBG) was measured. If the RBG was more than 16.7mmol/L, we think those rats were the type 2 diabetic rats. Then those rats were randomly divided into four groups by using the random number table method: intervention group A ($n = 6$), non-intervention group B ($n = 12$), hyperbaric oxygen therapy group A ($n = 6$) and hyperbaric oxygen therapy group B ($n = 12$). 10 days after the injection, the Morris water maze was used to test the cognitive function of non-intervention A group and hyperbaric oxygen treatment group A. 6 rats were randomly selected from blank

control group, non-intervention B group and hyperbaric oxygen treatment group B, and their brain were used for the NGF mRNA test. 15 days after the injection, rats in hyperbaric oxygen group A and B were given hyperbaric oxygen intervention (1 times /d). 20 days after treatment, the rats in each group were tested for their cognitive function and NGF mRNA. **Results** Compared with non-intervention group A, the latency period of escape in hyperbaric oxygen group A was significantly shortened ($P < 0.05$) and the number of times the rats traversed the virtual platform was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with non-intervention group B, the expression level of NGF mRNA in brain tissue of hyperbaric oxygen treatment group B was increased ($P < 0.05$). **Conclusions** Hyperbaric oxygen therapy can significantly improve the cognitive function of T2DM rats and improve the expression level of NGF mRNA in brain tissue. The results suggest that hyperbaric oxygen therapy can improve the cognitive function in early T2DM patients effectively, and the mechanism may be related to the effect of hyperbaric oxygen on NGF mRNA expression in brain tissue.

Keywords: diabetes mellitus, Type 2; hyperbaric oxygenation; cognition; nerve growth factor; microRNAs

2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 认知功能受损如未得到有效干预, 可逐渐演变为人格改变和生活活动能力缺失, 甚至痴呆症^[1]。研究证实, T2DM 可导致脑组织神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 缺失^[2]。高压氧疗法广泛应用于各种脑损伤, 但目前尚未查及国内外高压氧对 T2DM 认知功能及脑组织 NGF 影响作用的相关报道。本研究首次采用高压氧对 T2DM 大鼠进行治疗性干预, 旨在探讨 T2DM 脑组织中 NGF microRNA (NGF mRNA) 表达与认知功能的关系, 为高压氧治疗 T2DM 脑病提供必要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

48 只健康成年 SD 大鼠, 体重 240 ~ 280 g, 由成都医学院动物实验中心提供, 许可证号: SYXK (川) 2015-196, 按随机数字表法分为空白对照组 (12 只)、T2DM 模型组 (36 只)。模型复制成功后, T2DM 模型组大鼠再次按随机数字表法分为非干预 A 组 (6 只)、非干预 B 组 (12 只), 以及高压氧 A 组 (6 只)、高压氧 B 组 (12 只)。注射链脲佐菌素 10 d 后, 非干预 A 组、高压氧 A 组大鼠行 Morris 水迷宫实验检测认知功能; 空白对照组、非干预 B 组、高压氧 B 组各随机取 6 只大鼠脑组织检测 NGF mRNA。高压氧疗程结束, 非干预 A 组、高压氧 A 组再次行认知功能测验; 空白对照组、非干预 B 组、高压氧 B 组检测 NGF mRNA。

1.2 材料及主要设备

Trizol、DEPC 及逆转录聚合酶链反应 (reverse

transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司, 链脲佐菌素 (美国 Sigma 公司), 实验小动物高压氧舱 (烟台宏远药业有限公司 G2-Y900-002 型), Morris 水迷宫实验系统 (上海吉量科技有限公司)。

1.3 T2DM 模型复制

T2DM 模型组大鼠置于 (25 ± 2) °C 室温适应性饲养 1 周, 测得尾静脉血空腹血糖 ≤ 5.5 mmol/L, 复制 T2DM 大鼠模型^[3]: 高糖高脂饮食饲养 4 周, 禁食、不禁水 12 h, 经腹腔单次注入 1% 链脲佐菌素 (35 mg/kg), 3 d 后测得尾静脉随机血糖 ≥ 16.7 mmol/L, 确定模型复制成功。

1.4 高压氧治疗

注射后 15 d 开始, 每天定时将高压氧 A、B 组大鼠置入高压氧舱, 纯氧洗舱 10 min 后设置 20 min 内匀速加压至 2.5 个绝对大气压, 稳压吸纯氧 40 min, 20 min 匀速减压出舱, 1 次 /d, 共 20 d^[4]。空白对照组及非干预 A、B 组大鼠不予任何干预。

1.5 Morris 水迷宫认知功能测验

Morris 水迷宫认知功能测验包括: ①定位航行实验。大鼠先连续训练 3 d, 3 次 /d, 平台保持固定位置, 训练结束次日记录大鼠 120 s 内从入水到爬上平台所花费的时间, 为逃避潜伏期; ②空间探索实验。第 5 天去除平台, 随机选择训练象限, 将大鼠面壁置入水池, 记录大鼠 120 s 内自由穿越虚拟平台的次数。定位航行考察大鼠学习能力, 空间探索考察大鼠空间记忆能力^[5]。

1.6 脑组织 NGF mRNA 检测

参考文献 [6] 及试剂盒说明书, 采用 RT-PCR 检测大鼠脑组织 NGF mRNA。大鼠麻醉后处死取脑组织, 采用 Trizol 法提取总 RNA 逆转录为 cDNA。NGF 正向引物: 5' -GCTGCACGTAGCCACCGGAC-3', 反向引物: 5' -GCAGCTAGTGCTGCCGTCTA-3'; β -actin 为内参定量分析 NGF mRNA, β -actin 正向引物: 5' -GCGTGATCGCTGCCGAGAC-3', 反向引物: 5' -CCGCGGTCGCACTCGATAC-3'。PCR 反应结束, 产物用琼脂糖凝胶电泳和凝胶成像系统进行分析。

1.7 统计学方法

数据分析采用 SPSS 23.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用方差分析或 t 检验, 进一步两两比较用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般及血糖情况

T2DM 模型大鼠反应变慢, 皮毛光泽下降, 出现多饮、多食、多尿现象, 消瘦、精神状态变差等, 高压氧治疗后, 大鼠上述症状有所改善。

2.2 高压氧 A 组与非干预 A 组大鼠认知功能比较

高压氧治疗 20 d 后, 高压氧 A 组与非干预 A 组逃避潜伏期比较, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 高压氧 A 组较短; 高压氧 A 组与非干预 A 组穿越虚拟平台次数比较, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 高压氧 A 组次数较多。见表 1。

表 1 两组大鼠逃避潜伏期、穿越虚拟平台次数比较

($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	逃避潜伏期 /s	穿越虚拟平台次数
非干预 A 组	47.68 \pm 0.29	1.94 \pm 0.45
高压氧 A 组	22.68 \pm 0.35	4.12 \pm 0.69
t 值	9.572	-27.387
P 值	0.000	0.000

2.3 各组大鼠脑组织 NGF mRNA 水平比较

治疗前, 空白对照组、非干预 B 组、高压氧 B 组脑组织 NGF mRNA 水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 进一步两两比较经 LSD- t 检验, 非干预 B 组、高压氧 B 组低于空白对照组 ($P < 0.05$)。高压氧治疗 20 d 后, 空白对照组、非干预 B 组、高

压氧 B 组脑组织 NGF mRNA 水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 进一步两两比较经 LSD- t 检验, 高压氧 B 组高于非干预 B 组和空白对照组 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 3 组大鼠脑组织 NGF mRNA 水平比较

($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	治疗前	治疗 20 d
空白对照组	0.93 \pm 0.47	0.97 \pm 0.14
非干预 B 组	0.31 \pm 0.64 ¹⁾	0.29 \pm 0.87
高压氧 B 组	0.34 \pm 0.59 ¹⁾	0.78 \pm 0.61 ²⁾
F 值	41.639	35.258
P 值	0.000	0.000

注: 1) 与空白对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与非干预 B 组比较, $P < 0.05$

3 讨论

大量研究证实, 糖尿病患者是血管性痴呆和阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 的高危人群, 主要表现为学习、记忆、思维、逻辑等能力衰退, T2DM 是主要的糖尿病类型, 随着病情发展, 患者可出现行为异常, 甚至丧失社会参与能力^[7]。本实验采用高糖高脂 + 链脲佐菌素腹腔注射复制 T2DM 大鼠模型, 模拟人类 T2DM 发病进程。Morris 水迷宫测验显示, T2DM 模型大鼠学习记忆能力明显下降, 脑组织 NGF mRNA 表达水平下降, 提示模型复制成功。结果显示, 经过 20 d 高压氧治疗, 大鼠血糖降低, 糖尿病症状改善, 逃避潜伏期缩短, 穿越虚拟平台次数增多, 较非干预组明显改善, 说明高压氧对 T2DM 认知功能障碍的康复起积极作用。其机制可能为^[8-9]: ①调节机体糖脂代谢, 改善脑组织微循环及细胞代谢, 有利于脑高级功能恢复; ②提高脑组织氧自由基清除能力, 抑制炎症反应, 改善脑细胞肿胀变性; ③调节神经活性物质表达水平, 促进脑细胞及髓鞘的修复; ④提高机体氧化应激, 调节免疫功能, 抑制细胞凋亡。

NGF 是重要的神经营养因子之一。近年来研究证实, 缺血性和出血性脑损伤的脑组织 NGF 阳性表达增强, NGF mRNA 表达上调, 有利于防止神经元死亡, 改善神经系统的病理变化, 促进神经系统的再生与修复^[10-11]。AD 模型大鼠接受 NGF 移植入海马区, 其神经行为学得到显著提高^[12]。近年来高压氧治疗糖尿病并发症获得较好疗效, 有报道称连续 40 d 高压氧

治疗后, 糖尿病周围神经病变患者四肢疼痛症状缓解, 肢体运动及感觉神经传导速度改善优于对照组^[13]。糖尿病足患者经高压氧治疗后创面愈合情况明显改善, 血清血管内皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子水平升高^[13]。本实验结果显示, T2DM 模型大鼠 NGF mRNA 表达水平低于空白对照组, 说明 T2DM 可显著降低脑组织 NGF 的合成。参照人类高压氧治疗模式, 对 T2DM 大鼠进行 2 个疗程共 20 d 的高压氧治疗, 治疗结束后大鼠脑组织 NGF mRNA 表达水平高于非干预组, 说明高压氧疗法可促进脑组织 NGF 合成、代谢, 提高表达水平, 有利于脑细胞及神经轴突的损伤后修复, 进而改善学习、记忆等认知功能。NGF 对脑高级功能的积极作用可能与其特有的神经保护生物活性有关, 如抑制超氧自由基、毒性氨基酸的释放及脑细胞凋亡等^[14-15]。尽管糖尿病认知功能障碍越来越受到学者及医务工作者的重视, 但目前治疗方式仍较局限, 主要依靠药物及认知训练、作业疗法等康复治疗技术。高压氧疗法能否作为常规治疗手段长期介入, 本研究或许能提供较坚实的实验基础及理论依据。

参 考 文 献:

- [1] KIMURA N. Diabetes mellitus induces Alzheimer's disease pathology: histopathological evidence from animal models[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(4): 503-508.
- [2] 唐明薇, 黎瑶, 王风波. 口服降糖药致低血糖对糖尿病大鼠神经生长因子 mRNA 表达的影响 [J]. *重庆医学*, 2017, 46(8): 1017-1019.
- [3] 陆少君, 曾伟斌, 臧林泉. 2 型糖尿病大鼠模型制备实验研究 [J]. *广东药科大学学报*, 2017, 33(5): 624-628.
- [4] 贺仕清, 邹云龙, 雷北平. 高压氧对脑外伤大鼠脑内兴奋性氨基酸水平的影响 [J]. *中华神经创伤外科电子杂志*, 2016, 2(5): 289-292.
- [5] 周娇娇, 阙建宇, 于雯雯, 等. Morris 水迷宫检测动物学习记忆水平的方法学 [J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(24): 6274-6277.
- [6] 唐明薇, 黎瑶, 王风波. 胰岛素致低血糖对糖尿病大鼠 NGF mRNA 表达的影响 [J]. *中国医药导报*, 2017, 14(12): 25-28.
- [7] 明淑萍, 刘玲, 屈月清, 等. 糖尿病认知障碍发病机制的中西医结合研究进展 [J]. *时珍国医国药*, 2018, 29(1): 164-167.
- [8] 赵龙, 李红玲, 赵艳颖, 等. 不同吸氧时间高压氧治疗对脑出血大鼠血肿周围 AQP4 和 SOD 表达的影响 [J]. *中国康复医学*, 2016, 31(11): 1213-1218.
- [9] 涂杳然, 牛凡, 洪德全, 等. 高压氧治疗对大鼠创伤性脑损伤后 Nogo-A 及 NgR 表达的影响 [J]. *中国当代医药*, 2017, 24(33): 7-9.
- [10] LEWIN G R, LECHNER S G, SMITH A S. Nerve growth factor and nociception: from experimental embryology to new analgesic therapy[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2014, 220(2): 251-282.
- [11] 邓莹, 李劲涛, 曹光琼. NGF-BMSCs 移植对阿尔兹海默病大鼠神经行为学的改善 [J]. *昆明医科大学学报*, 2017, 38(6): 5-8.
- [12] 杨驱云, 梁钊明, 洪丽文, 等. 高压氧综合治疗 2 型糖尿病周围神经病变的临床体会 [J]. *泰山医学院学报*, 2016, 37(12): 1333-1335.
- [13] 曾宪忠, 刘旻, 李毅. 高压氧治疗糖尿病足的疗效评价及对患者血清 VEGF, bFGF 水平的影响 [J]. *中国现代医学杂志*, 2016, 26(19): 110-113.
- [14] 牛彦彦, 鲍春龄, 岳亚琳, 等. 头穴透刺对脑出血大鼠血肿周围脑组织神经生长因子表达的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2016, 36(9): 1107-1111.
- [15] 李光, 邱茜茜, 贺迎坤, 等. 神经生长因子基因修饰骨髓间充质干细胞移植治疗脑梗死大鼠的实验研究 [J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2018, 21(7): 702-707.

(童颖丹 编辑)