

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.03.005

文章编号: 1005-8982(2017)03-0022-05

## 外源性胰岛素样生长因子-1 对老年小鼠认知功能的影响\*

吴连连<sup>1</sup>, 袁红花<sup>2</sup>, 朱孝荣<sup>1</sup>

(徐州医科大学 1. 实验动物中心, 2. 神经生物研究中心, 江苏 徐州 221004)

**摘要:** **目的** 探讨胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 对老年小鼠认知功能的影响机制。**方法** 给予老年 C57/BL6 小鼠侧脑室注射 IGF-1, Western blot 检测胰岛素样生长因子-1 受体 (IGF-1R) 蛋白的表达, 5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (BrdU) 荧光染色标记海马齿状回增殖的细胞, 尼氏染色标记海马齿状回神经元, 用 Morris 水迷宫实验和跳台实验评定老年小鼠学习记忆能力。**结果** Western blot 检测显示, IGF-1 组老年小鼠海马中 IGF-1R 表达与对照组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。BrdU 染色结果显示, IGF-1 组海马 BrdU 阳性细胞数与对照组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。尼氏染色结果显示, IGF-1 组神经元细胞数与对照组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。水迷宫实验结果显示, 经过训练后, IGF-1 组老年小鼠的逃避潜伏期短于对照组, 穿过平台的次数与对照组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。跳台实验结果显示, 与对照组比较, IGF-1 组老年小鼠的基础错误次数减少, 而潜伏期延长 ( $P < 0.05$ )。**结论** 老年小鼠注射 IGF-1 后, 其认知功能有一定改善, IGF-1 可以提高老年小鼠认知功能。

**关键词:** 胰岛素样生长因子-1; 老年鼠; 5-溴脱氧尿嘧啶核苷; 水迷宫; 认知功能

**中图分类号:** R322.81

**文献标识码:** A

## Effect of exogenous insulin-like growth factors 1 on cognitive function in aged mice\*

Lian-lian Wu<sup>1</sup>, Hong-hua Yuan<sup>2</sup>, Xiao-rong Zhu<sup>1</sup>

(1. Laboratory Animal Center; 2. Research Center for Neurobiology,  
Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221004, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effects of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) on cognitive function in aged mice after microinjection of IGF-1. **Methods** IGF-1 was injected into the lateral ventricles of aged C57/BL6 mice. The expression of IGF-1R was assayed by Western Blot. The proliferative cells of the hippocampal dentate gyrus were marked by 5-bromodeoxyuridine (BrdU) immunofluorescence. The neurons of the hippocampal dentate gyrus were determined by Nissl staining. Morris water maze and step-down test were performed to evaluate the cognitive function of the aged mice. **Results** Western blot results showed that the protein level of IGF-1R increased in the IGF-1 treated group compared with the control group ( $P < 0.05$ ). BrdU immunofluorescent results revealed BrdU-positive cells were obviously increased in the IGF-1 treated group compared to the control group ( $P < 0.05$ ). Nissl staining revealed the increased number of neurons in the IGF-1 treated group compared with the control group ( $P < 0.05$ ). Morris water maze test showed that escape latency of the IGF-1 treated group was significantly shorter than that of the control group after training, and the number of times through the platform was significantly larger than that of the control group ( $P < 0.05$ ). Step-down test showed that the number of times of basal errors was dramatically smaller, and the latency was significantly

收稿日期: 2016-05-31

\* 基金项目: 江苏省自然科学基金 No: BK2010180, BK20151151)

[通信作者] 朱孝荣, E-mail: zxr1967@126.com; Tel: 0516-83262060

longer in the IGF-1 treated group compared with the control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** After injection of IGF-1, the neurocognitive functions of aged mice were improved, so we may indicate that IGF-1 may improve the cognitive function in aged mice.

**Keywords:** insulin-like growth factors 1; aged mice; 5-bromo-2-deoxyuridine; Morris water maze; cognitive function

衰老是动物体内普遍存在的一个自然的生物学过程。随着年龄的增长,大脑功能也呈现衰退的现象。老年人常表现出学习记忆、认知能力的下降,这与脑老化、神经系统退变有关。海马是大脑中与学习记忆功能关系最密切的一个脑区结构<sup>[1]</sup>,脑老化及神经系统退变都与海马结构的变化有着密切的关系。

胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factors-1, IGF-1) 是一种细胞分裂素,在神经细胞增殖、分化、细胞成活中起重要作用<sup>[2-3]</sup>。随着年龄的增长及神经系统病变引起的认知缺陷可能与 IGF-1 缺乏有关<sup>[4]</sup>。本实验拟通过给予老年小鼠海马注射 IGF-1,研究老年鼠海马神经发生的变化及其学习记忆能力的改变,以探讨外源性 IGF-1 对老年小鼠认知功能的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 一般材料

**1.1.1 实验动物** 24个月龄 C57/BL6 小鼠 40只,雌雄各半,体重 30~35 g,由徐州医科大学实验动物中心提供。随机分组为对照组 (12只)、生理盐水组 (14只) 和 IGF-1 组 (14只)。

**1.1.2 试剂与仪器** 重组人 IGF-1 (美国 Chemicon 公司), 5-溴脱氧尿嘧啶核苷 5-bromo-2-deoxyuridine, BrdU (美国 Sigma 公司), 小鼠抗 BrdU 单克隆抗体 (德国 Calbiochem 公司), 小鼠抗胰岛素样生长因子-1受体 insulin-like growth factor 1 receptor, IGF-1R) 单克隆抗体 (美国 Santa Cruze 公司), 山羊抗小鼠免疫球蛋白 G/异硫氰酸荧光素 (美国 Bioworld 公司), 尼氏染色液 上海碧云天生物技术有限公司), Morris 水迷宫系统 (美国 Actimetrics 公司), 小鼠跳台仪 (D. rT-2) (安徽淮北正华生物仪器设备有限公司), 脑立体定位仪 (美国 David Kopf Instruments 公司)。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 立体定位注射** 小鼠经麻醉后,固定于脑立体定位仪上,头顶部去毛,消毒皮肤,头顶部正中切口,暴露前囟,按小鼠脑立位图谱,坐标为 AP:0.02 mm, ML:8.50 mm, DV:22.50 mm), 注射 2  $\mu$ l IGF-1。留

针 5 min,慢慢退出注射器,退针 2 min。对照组注射等量的生理盐水。

**1.2.2 BrdU 给药** 先配制好 10 mg/ml BrdU 溶液,按预设的时间点给各组小鼠腹腔注射 BrdU。给药剂量为每次 50 mg/kg,腹腔注射 6次,1次/12 h,连续 3 d,最后 1次注射 24 h 后灌注固定取脑。

**1.2.3 Western blot 检测** 海马组织加入适量的蛋白裂解液,匀浆器匀浆,静置 15 min,4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 20 min,吸取上清。蛋白质定量试剂盒测定蛋白浓度,加入相应量的 4 $\times$  十二烷基硫酸钠上样缓冲液,沸水煮 5 min 处理蛋白。等量蛋白样品经 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分离后,用半干转法电转移至硝酸纤维素膜上。经 5%牛血清白蛋白封闭后加入抗体,IGF-1R 抗体 1:600,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。洗涤后加入相应的二抗 [IRD ye<sup>TM</sup> 680 cm 标记的山羊抗小鼠抗体 1:1 000], 室温避光孵育 1 h,洗膜。Odyssey 激光成像系统扫描,结果以图像处理仪分析处理。

**1.2.4 BrdU 免疫荧光染色** 小鼠经 4%多聚甲醛灌注固定,取脑,固定过夜。经 30%蔗糖脱水沉糖,行冷冻切片,切片厚 10  $\mu$  m,先以 2 mol 盐酸溶液处理使 DNA 变性,37 $^{\circ}$ C 30 min,以 pH=8.5 的 0.1 mol 硼酸室温和 10 min,10%山羊血清封闭 40 min,滴加一抗, BrdU 抗体 (1:500), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。滴加荧光二抗 (1:100) 孵育 1.5 h,封片并于荧光显微镜下观察拍照。

**1.2.5 尼氏染色** 冻切片 10  $\mu$  m 充分晾干,70%酒精脱脂 >4 h,入蒸馏水洗数分钟;0.05%焦油紫醋酸水溶液染色数分钟 (镜下观察),100%酒精 1 min,二甲苯透明,封片。

**1.2.6 Morris 水迷宫实验** 实验室温度保持在 24~26 $^{\circ}$ C,水面高过安全平台 1 cm,水温保持在 20~22 $^{\circ}$ C。将小鼠面向池壁分别从 4 个人水点放入水中,记录其在 90 s 内找到安全平台的时间 (潜伏期)。如果大鼠在 90 s 内未能找到平台,则由实验人员用手牵引至平台上,让大鼠停留 20 s,再放回笼中,潜伏期记作 90 s。实验 1~7 d,3次/d,其中第 1~4 天为训练期,第 5~7 天为定位航行测试,第 8 天,为空间探测

能力评估。第 8 天,移去平台,让小鼠自由游泳 120 s,并记录下 120 s 内小鼠穿过平台位置的次数,作为空间探测能力评估。

**1.2.7 跳台实验** Morris 水迷宫实验结束后,小鼠休息 5 d,进行跳台实验,测试各组小鼠学习和记忆功能。实验时,保持实验室内安静,维持室温在 24~26℃。将参加实验的各组小鼠先放入反应箱内自由活动 5 min,熟悉环境。然后接通铜栅电源 0.25 mA,交流电流,小鼠受到电击后其正常反应是寻找安全跳台以躲避电击。记录各组小鼠跳下安全跳台的时间(潜伏期)和 5 min 内受到的电击次数(错误次数),作为记忆测试成绩。实验时,若小鼠停留在安全跳台的时间 >5 min,其潜伏期以 5 min 计算。

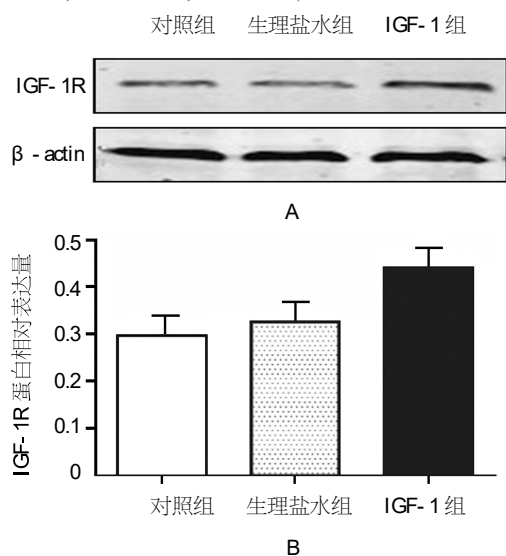
### 1.3 统计学方法

利用图像软件 Photoshop 5.0 对图像进行统计学分析,资料用 SPSS 16.0 统计软件处理,计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较用单因素方差分析(One-Way, ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 海马内 IGF-1R 蛋白的表达

提取 IGF-1 组、生理盐水组及对照组海马蛋白,做 Western blot 检测,结果显示,IGF-1 组海马内 IGF-1R 蛋白相对表达量(0.44±0.04)高于生理盐水组(0.31±0.04)及对照组(0.29±0.05),差异有统计学意义( $F=0.372, P=0.038$ )。见图 1。



A: 各组小鼠海马 IGF-1R 蛋白的 SDS-PAGE 凝胶电泳分离结果; B: 各组小鼠海马 IGF-1R 蛋白相对表达量 ( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

图 1 各组小鼠海马 IGF-1R 蛋白的表达

### 2.2 海马内 BrdU 阳性细胞数的变化

以 BrdU 标记海马内新增殖的细胞,免疫荧光染色结果显示,IGF-1 组 BrdU 阳性细胞数(14.00±0.57)高于生理盐水组(4.00±1.00)及对照组(4.00±0.57),差异有统计学意义( $F=0.258, P=0.006$ )。见图 2。

### 2.3 海马内尼氏染色结果

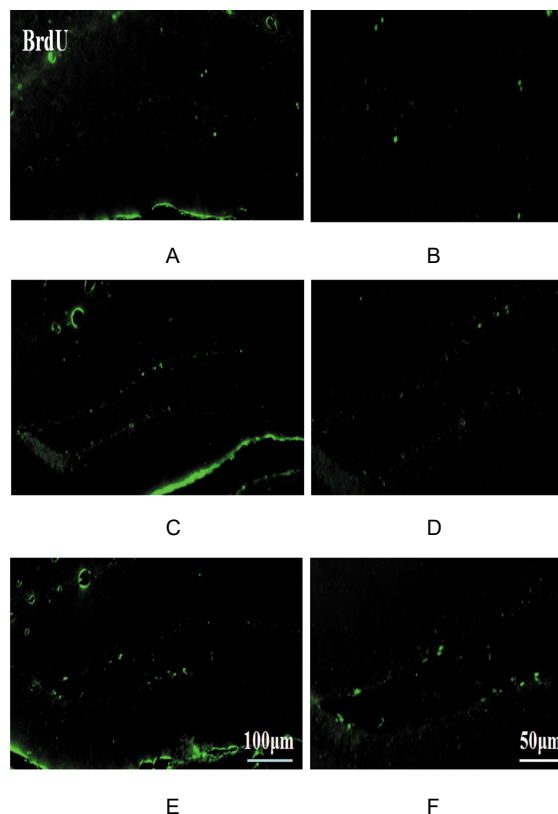
以尼氏染色法观察海马神经元细胞的分布,结果显示,IGF-1 组神经元细胞数(329.00±4.91)高于生理盐水组(254.00±6.11)及对照组(257.00±3.28),差异有统计学意义( $F=2.362, P=0.008$ )。见图 3。

### 2.4 Morris 水迷宫实验结果

将各组小鼠进行行为学实验测试,在水迷宫实验中,与生理盐水组及对照组比较,IGF-1 组小鼠搜索平台潜伏期缩短,差异有统计学意义( $F=5.189, P=0.023$ );穿过平台的次数明显增多,差异有统计学意义( $F=2.486, P=0.017$ )。见图 4。

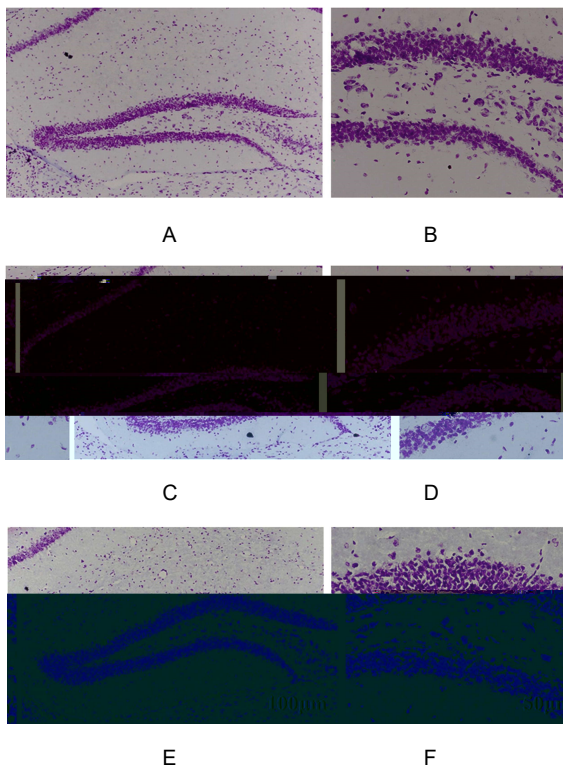
### 2.5 跳台实验结果

跳台实验结果显示,与生理盐水组及对照组比较,IGF-1 组小鼠基础错误次数减少( $F=6.726, P=0.020$ ),潜伏期延长( $F=21.328, P=0.031$ )。见图 5。



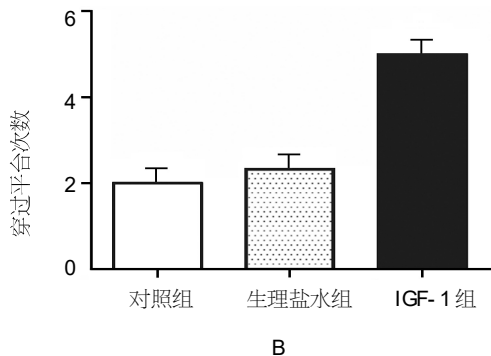
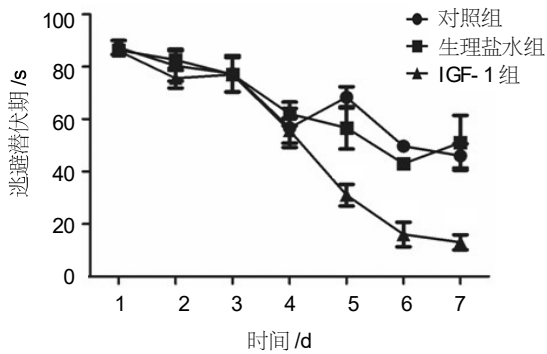
A: 对照组 × 100; B: 对照组 × 200; C: 生理盐水组 × 100; D: 生理盐水组 × 200; E: IGF-1 组 × 100; F: IGF-1 组 × 200

图 2 各组小鼠海马齿状回 BrdU 免疫荧光染色结果



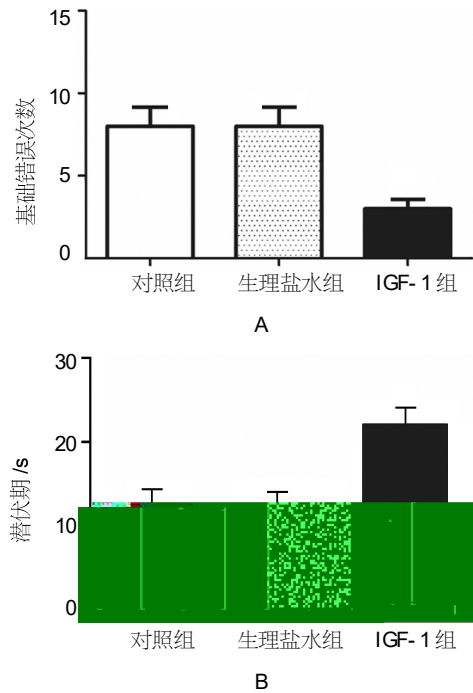
A:对照组 × 100);B:对照组 × 200);C:生理盐水组 × 100); D:生理盐水组 × 200);E:IGF-1组 × 100);F:IGF-1组 × 200)

图 3 各组小鼠海马齿状回尼氏染色结果



A: 各组小鼠水迷宫实验第 1~7 天 90 s 内找到平台的逃避潜伏期;B: 水迷宫实验的第 8 天各组小鼠穿过平台的次数 (n=12,  $\bar{x} \pm s$ )

图 4 水迷宫实验结果



A: 各组小鼠跳台实验的基础错误次数;B: 各组小鼠跳台实验的潜伏期

图 5 跳台实验结果 (n=12,  $\bar{x} \pm s$ )

### 3 讨论

老化过程常常伴随着记忆的减退,甚至病理状态的变化<sup>[4-6]</sup>。在老年大脑中,发现有很多与年龄相关的变化,如突触传递的损伤,神经递素的合成和释放,长时程增强作用,葡萄糖的利用,受体浓度等<sup>[7-9]</sup>。一直以来,海马被认为是大脑中参与学习记忆等活动最主要的一个结构,在老年动物海马功能的一系列改变中,最显著的变化是齿状回活性的减弱<sup>[10]</sup>。

IGF-1 是一种在大脑功能中有多种作用的多肽,广泛表达于大脑多个部位,且在海马齿状回神经发生和突触形成具有重要作用。随着年龄的增长,老年动物学习记忆能力呈现衰退现象,这可能与脑中 IGF-1 的浓度下降有关。LEE 等<sup>[11]</sup>研究表明,IGF-1 和 IGF-1R 在老年小鼠海马中的表达下降。然而,也有研究表明,IGF-1 水平在老年鼠和年轻鼠中并未有差异<sup>[12]</sup>,尽管这个问题至今还存在争议,但是 IGF-1 在动物衰老过程及海马认知能力上的作用不容忽视。已有文献证实,IGF-1 通过与其受体结合,提升细胞内酪氨酸激酶活性,从而激活丝裂原活化蛋白激酶、磷脂酰肌醇-3 激酶信号通路,调控细胞周期、基因表达、细胞增殖等<sup>[13]</sup>。本课题组前期利用过表达 IGF-1 的转基因小鼠,研究表明,IGF-1 在体内可以促进成

年小鼠神经干细胞增殖和分化,从而促进神经发生<sup>[14]</sup>。IGF-1 还影响神经元成熟过程包括神经递素的产生,以及电生理活性等多个方面<sup>[19]</sup>。本实验结果显示,老年鼠侧脑室注射 IGF-1 后,海马内受体蛋白 IGF-1R 的表达会提高,并且新增殖细胞数和神经元数也明显增多,这提示外源性 IGF-1 在老年鼠体内与受体结合,并促进海马神经细胞增殖和神经元产生。

目前,关于海马神经发生与认知能力的相关性还有一些争议,有报道表明,认知缺陷与海马全部或部分神经发生功能的丧失密切相关,COUILLARD 等<sup>[16]</sup>认为,神经发生不是学习能力的必要因素,但可以促进其功能。ANDERSON 等<sup>[17]</sup>认为,老化过程与神经发生及 IGF-1 水平的降低有关,注射 IGF-1 的老年大鼠其脑内神经发生会增加并且认知障碍得到一些恢复。笔者的行为学试验结果表明,给予外源性 IGF-1 注射后,可以提高老年小鼠的学习记忆有关的认知能力,但 IGF-1 是否直接通过促进老年鼠海马的神经发生等活动来提高认知功能,还不能十分确定,或许是有有一定关系,但仍需进一步研究,这也是目前为止还存在争议的一个问题。但本研究结果表明,IGF-1 可以促进老年小鼠的学习、记忆等认知能力的提高。

#### 参 考 文 献:

- [1] SHARON G, JANINE M, DAVID G, et al. Impairment on a self-ordered working memory task in patients with early-acquired hippocampal atrophy [J]. *Developmental Cognitive Neuroscience*, 2016, 20: 12-22.
- [2] D'ERCOLE A, YE P, CALIKOGLU A, et al. The role of the insulin-like growth factors in the central nervous system[J]. *Mol Neurobiol*, 1996, 13(3): 227-255.
- [3] HH Y, RJ C, LL W, et al. The regulatory mechanism of neurogenesis by IGF-1 in adult mice[J]. *Mol Neurobiol*, 2015, 51(2): 512-522.
- [4] 上官芳芳,施建农.生长激素/IGF-1 对认知功能的影响[J]. *中国心理卫生杂志*, 2007, 21(8): 568-570.
- [5] BURKE S, BARNES C. Neural plasticity in the ageing brain[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2006, 7(1): 30-40.
- [6] WILSON I, GALLAGHER M, EICHENBAUM H, et al. Neurocognitive aging: prior memories hinder new hippocampal encoding[J]. *Trends Neurosci*, 2006, 29(12): 662-670.
- [7] QU X, XU C, WANG H, et al. Hippocampal glutamate level and glutamate aspartate transporter (GLAST) are up-regulated in senior rat associated with iso urane-induced spatial learning/memory impairment[J]. *Neurochem Res*, 2013, 38(1): 59-73.
- [8] WILLIAMS T, MITTERLING K, THOMPSON L, et al. Age- and hormone-regulation of opioid peptides and synaptic proteins in the rat dorsal hippocampal formation[J]. *Brain Res*, 2011, 1379: 71-85.
- [9] ZHANG D, GUO Q, BIAN C, et al. Alterations of steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) immunoreactivities in specific brain regions of young and middle-aged female Sprague-Dawley rats[J]. *Brain Res*, 2011, 1382: 88-97.
- [10] GHEIDI A, AZZOPARDI E, ADAMS A, et al. Experience-dependent persistent expression of zif268 during rest is preserved in the aged dentate gyrus[J]. *Bmc Neuroscience*, 2013, 14(1): 1-11.
- [11] LEE CH, AHN JH, PARK JH, et al. Decreased insulin-like growth factor-I and its receptor expression in the hippocampus and somatosensory cortex of the aged mouse[J]. *Neurochemical Research*, 2014, 39(4): 770-776.
- [12] MOLINA D, ARIWODOLA O, LINVILLE C, et al. Growth hormone modulates hippocampal excitatory synaptic transmission and plasticity in old rats[J]. *Neurobiol Aging*, 2012, 33(9): 1938-1949.
- [13] GEORGES M, ANNA T, EMANUEL D. Insulin-like growth factor-1 promotes G<sub>1</sub>/S cell cycle progression through bidirectional regulation of cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors via the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt pathway in developing rat cerebral cortex[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2009, 29(3): 775-788.
- [14] YUAN H, CHEN R, WU L, et al. The regulatory mechanism of neurogenesis by IGF-1 in adult mice[J]. *Molecular Neurobiology*, 2015, 51(2): 512-522.
- [15] TORRES A. Insulin-like growth factors as mediators of functional plasticity in the adult brain[J]. *Hormone and Metabolic Research*, 1999, 31(2/3): 114-119.
- [16] COUILLARD D. Hippocampal neurogenesis and ageing, neurogenesis and neural plasticity[J]. Springer, 2012, 15: 343-355.
- [17] ANDERSON M F, ABERG M A, NILSSON M, et al. Insulin-like growth factor-I and neurogenesis in the adult mammalian brain[J]. *Brain Research Developmental Brain Research*, 2002, 134(1/2):115-122.

(童颖丹 编辑)