

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.12.001

文章编号: 1005-8982(2016)12-0001-05

论著

## 大鼠认知障碍对糖代谢的影响及其与肝脏和骨骼肌 糖原合成酶激酶-3 $\beta$ 表达水平的关系\*

杜森, 叶琳, 朱琳, 李阳阳, 夏春波

(桂林医学院 人体解剖学教研室, 广西 桂林 541004)

**摘要:目的** 探讨大鼠认知障碍对糖代谢的影响及其与肝脏和骨骼肌;糖原合成酶激酶-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) 表达的关系,为糖代谢的神经调节机制研究提供新的实验依据。**方法** A $\beta$ 1-42 大鼠海马内注射构建认知障碍模型,血糖仪检测大鼠空腹血糖 (FPG),半定量反转录-聚合酶链反应法 (RT-PCR) 检测肝脏与骨骼肌 GSK-3 $\beta$  mRNA 的表达,蛋白印迹法 (Western blot) 检测肝脏与骨骼肌 GSK-3 $\beta$  的表达。**结果** ①实验组大鼠 FPG 为 (7.99 $\pm$ 0.15)mmol/L,与假手术组和对照组比较显著升高 ( $P < 0.05$ )。②实验组大鼠肝脏和骨骼肌 GSK-3 $\beta$  mRNA 表达水平分别为 (0.47 $\pm$ 0.03)和 (0.26 $\pm$ 0.02),与假手术组和对照组比较均明显升高 ( $P < 0.05$ )。③实验组大鼠肝脏和骨骼肌 GSK-3 $\beta$  表达水平分别为 (0.47 $\pm$ 0.04)和 (0.26 $\pm$ 0.03),均显著高于假手术组与对照组 ( $P < 0.05$ )。**结论** 大鼠认知障碍可引起血糖水平的升高,其机制可能与认知障碍大鼠肝脏和骨骼肌 GSK-3 $\beta$  表达升高有关。

**关键词:** 认知功能障碍;糖代谢;糖原合成酶激酶-3 $\beta$

**中图分类号:** R338.26

**文献标识码:** A

## Effects of cognitive impairment in rats on glucose metabolism and its relations with expression of GSK-3 $\beta$ in liver and skeletal muscle\*

Sen Du, Lin Ye, Lin Zhu, Yang-yang Li, Chun-bo Xia

(Department of Anatomy, Guilin Medical University, Guilin, Guangxi, 541004, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effects of cognitive impairment in rats on glucose metabolism and its relation with the expression of GSK-3 $\beta$  in liver and skeletal muscle, and to provide a new experimental evidence for study of the neural mechanisms regulating glucose metabolism. **Methods** The A $\beta$ 1-42 was injected into the hippocampus to build cognitive impairment model of rats, and fasting blood glucose of rats was tested by blood glucose meter. Expression of GSK-3 $\beta$ mRNA and GSK-3 $\beta$  in liver and skeletal muscle were detected by RT-PCR and Western blot, respectively. **Results** In the experimental group, fasting blood glucose (FPG) was (7.99 $\pm$ 0.15) mmol/L, which was significantly higher than that in the sham group and the control group ( $P < 0.05$ ). The expressions of GSK-3 $\beta$  mRNA in liver and skeletal muscle of the experimental group were (0.47 $\pm$ 0.03) and (0.26 $\pm$ 0.02), which were significantly higher than other two groups ( $P < 0.05$ ). The expressions of GSK-3 $\beta$  in liver and skeletal muscle of the experimental group were (0.47 $\pm$ 0.04) and (0.26 $\pm$ 0.03), which also higher than other groups significantly ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Cognitive impairment in rats causes the elevation of glucose levels, which mechanism may related to the increase of expression of GSK-3 $\beta$  in liver and skeletal muscle.

**Keywords:** cognitive; impairment; glucose metabolism; glycogen synthase kinase-3 $\beta$

收稿日期:2015-12-20

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No:81260137)

[通信作者] 夏春波, E-mail: xiachunbo910@163.com; Tel:13977378285

老年痴呆是一种常见的慢性神经退行性病变,又名“阿尔兹海默病(Alzheimer's disease,AD)”。其发生发展与海马功能的受损密切相关,老年痴呆包括轻度认知障碍前期(pre-MCI)、轻度认知障碍期(mild cognitive impairment,MCI)和痴呆期 3 个时期,且其发展成不可逆转的趋势。AD 与糖尿病(diabetes mellitus,DM)关系密切,有些学者称之为“3 型糖尿病”<sup>[1-2]</sup>。有研究显示<sup>[3]</sup>,81%的 AD 患者伴随有糖代谢异常。糖原合成酶激酶-3 $\beta$ (glycogen synthase kinase-3 $\beta$ ,GSK-3 $\beta$ ) 在糖代谢的过程中扮有重要的角色,为进一步探讨 AD 对糖代谢的影响及其与肝脏和骨骼肌 GSK-3 $\beta$  表达水平的关系,本实验拟建立大鼠认知障碍模型,探讨其对糖代谢的影响及其与肝脏和骨骼肌 GSK-3 $\beta$  表达的关系,为糖代谢的神经调节机制研究提供新的实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

由桂林医学院实验动物中心(合格证号:SCXK桂 2007-000)提供健康 SD 大鼠 30 只,雌雄不分,体重约 200~250 g。水合氯醛由桂林医学院附属医学院提供,微量注射器购自西化仪(北京)科技有限公司,A $\beta$ 1-42 购自美国 Sigma 公司,血糖试纸购自强生(上海)医疗器材有限公司,Trizol 总 RNA 提取试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司,RevertAid™ 第一链 cDNA Synthesis 试剂盒购自美国 Thermo 公司。由美国 Invitrogen 公司在 GSK-3 $\beta$ 、 $\beta$ -actin 基因序列上设计并合成引物,GSK-3 $\beta$  正向引物:5'-CACCTGCCCTCTCAACTTTAC-3',GSK-3 $\beta$  反向引物:5'-GGTCTGTCCACGGTCTCCA-3',产物为 158 bp; $\beta$ -actin 正向引物:5'-GAGGGAAATCGTGC GTGAC-3', $\beta$ -actin 反向引物:5'-CTGGAAGGTGGA CAGTGAG-3',产物为 445 bp。辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司, $\beta$ -actin pAb、GSK-3 $\beta$  pAb 购自美国 Bioworld Technology 公司。

### 1.2 大鼠认知障碍模型的构建及实验分组

本实验分为实验组、假手术组和对照组,每组 10 只大鼠。实验组大鼠海马内注射 A $\beta$ 1-42 15  $\mu$ g,假手术组海马内注射等体积的 PBS 缓冲液,对照组不作任何处理。具体操作步骤为:采用 10%水合氯醛对大鼠进行腹腔麻醉(3 ml/kg),头部备皮,依照大鼠脑立体定位图谱将大鼠固定于脑立体

定位仪上,沿其头顶正中切开长约 8 mm 的纵形切口,充分暴露前囟,小型电钻钻开左侧海马上方颅骨(前囟后 3.8 mm,左旁开 2.2 mm),不同组别采用微量注射器缓慢垂直进针 2.9 mm 注入相应的试剂,缝合皮肤,并在缝合口处涂抹青霉素,以防感染,继续饲养(每周换 3 次垫料)。运用 Morris 水迷宫实验检测大鼠认知功能。认知功能障碍评定标准:大鼠定位航行时间、跨越平台次数及在原平台象限时间百分比这 3 项指标中的任意 2 项与对照组比较差异有统计学意义,则判定为认知功能障碍。

### 1.3 大鼠空腹血糖水平的检测

造模后大鼠继续饲养 45 d,利用血糖仪检测大鼠空腹血糖(fasting plasma glucose,FPG),具体操作方法:大鼠空腹 12 h,75%酒精清洁大鼠尾尖,消毒手术剪,剪去少许尾尖,使血液自然流出,按照血糖仪说明书检测大鼠 FPG 水平。

### 1.4 大鼠肝脏与骨骼肌组织样本采集

采用 10%水合氯醛对大鼠进行腹腔麻醉(3 ml/kg),腹部及大腿备皮,打开腹腔和大腿处皮肤,剪取部分大鼠肝脏以及骨骼肌分别装入冻存管,然后快速放入液氮灌中,12 h 后将冻存管从液氮灌转移至 -80 $^{\circ}$ C 冰箱冷冻保存。

### 1.5 RT-PCR 法测定肝脏与骨骼肌 GSK-3 $\beta$ mRNA 的表达水平

从 -80 $^{\circ}$ C 冰箱取出肝脏(骨骼肌)组织并在液氮中研磨充分,利用 Trizol 总 RNA 提取试剂盒提取样本总 RNA,紫外分光光度计检测总 RNA 的纯度和浓度,A260/A280 比值在 1.8~2.0 为最佳,置入 -80 $^{\circ}$ C 冰箱内短时间冷冻保存备用,用 RevertAid™ 第一链 cDNA Synthesis 试剂盒逆转录总 RNA 最终得到稳定的 cDNA,然后分别运用 GSK-3 $\beta$  引物和  $\beta$ -actin 引物进行 PCR 扩增,反应条件为:预变性 94 $^{\circ}$ C 2 min,变性 94 $^{\circ}$ C 30 s,退火 65 $^{\circ}$ C 30 s,延伸 72 $^{\circ}$ C 30 s 共 32 个循环,终延伸 72 $^{\circ}$ C 2 min。2%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物,全自动数码凝胶成像分析系统拍照,计算光密度值并加以分析。

### 1.6 蛋白印迹法(Western blot)法测定肝脏与骨骼肌 GSK-3 $\beta$ 的表达水平

从 -80 $^{\circ}$ C 冰箱取出肝脏(骨骼肌)组织并在液氮中研磨充分,加入到盛有适量 RIPA 组织细胞裂解液的 EP 管中,充分震荡,静置 15 min,快速离心并吸取上清,采用 BCA 蛋白定量试剂盒检测所提取蛋白质浓度,制备上样蛋白样本,按照步骤:蛋白样本

SDS-PAGE 电泳→转膜→封闭→TBST 洗膜→孵育 GSK-3 $\beta$  ( $\beta$ -actin)一抗→TBST 洗膜→孵育二抗→TBST 洗膜→发光,逐步操作。测定蛋白条带光密度值,并分析。

### 1.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,计量资料用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间差异性比较用单因素方差分析(One-way ANOVA),方差分析有统计学意义,两两比较用 LSD- $t$  或 Dunnett- $t$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 模型建立结果

大鼠饲养 45 d 后,实验组大鼠死亡 1 只,存活 9 只,且表现为体型变瘦,皮毛粗糙,运动迟缓;假手术组大鼠死亡 1 只,存活 9 只;对照组大鼠无死亡,存活 10 只。实验组与对照组大鼠体征无差异。

### 2.2 Morris 水迷宫实验对各组大鼠认知功能的检测结果

对各组大鼠运用水迷宫实验检测认知功能结果显示,实验组大鼠定位航行时间为(85.19  $\pm$  2.41)s,明显高于假手术组与对照组的(43.80  $\pm$  10.32)s 和(47.20  $\pm$  11.24)s( $P < 0.01$ );在空间探索实验中实验组大鼠跨越平台的次数、在原平台象限时间百分比分别为(1.78  $\pm$  0.93)次、(18.43  $\pm$  5.75)%,与假手术组和对照组比较,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );而假手术组与对照组的所有指标比较差异无统计学意义( $P_1=0.434, P_2=0.304, P_3=0.061$ )(见附表)。结果提示本实验构建认知障碍大鼠模型取得良好的效果。

### 2.3 各组大鼠空腹血糖检测结果

利用血糖仪检测大鼠 FPG 水平结果显示,实验组大鼠 FPG 为(7.99  $\pm$  0.15)mmol/L,假手术组和对照组分别为(5.36  $\pm$  0.30)和(5.42  $\pm$  0.24)mmol/L,与假手术组和对照组比较,实验组大鼠 FPG 水平显著增高( $P < 0.01$ ),而假手术组和对照组 FPG 水平比较

附表 大鼠认知功能检测结果 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	定位航行时间/s	原平台象限时间/%	跨越平台次数/次
对照组( $n=10$ )	47.20 $\pm$ 11.24	36.67 $\pm$ 3.21	5.67 $\pm$ 0.54
假手术组( $n=9$ )	43.80 $\pm$ 10.32	34.34 $\pm$ 4.32	4.94 $\pm$ 0.62
实验组( $n=9$ )	85.19 $\pm$ 2.41 <sup>1)2)</sup>	18.43 $\pm$ 5.75 <sup>1)2)</sup>	1.78 $\pm$ 0.93 <sup>1)2)</sup>

注:1)与对照组比较, $P < 0.01$ ;2)与假手术组比较, $P < 0.01$

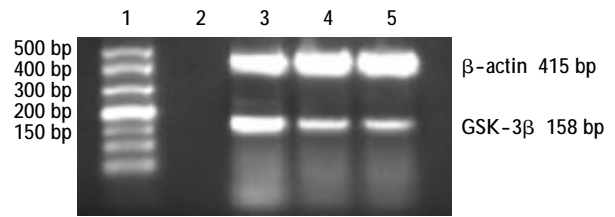
差异无统计学意义( $P=0.895$ )。

### 2.4 半定量反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测定肝脏与骨骼肌 GSK-3 $\beta$ mRNA 的表达水平结果

运用 RT-PCR 法检测各组大鼠肝脏与骨骼肌 GSK-3 $\beta$  mRNA 表达水平结果显示,实验组肝脏与骨骼肌 GSK-3 $\beta$  mRNA 表达水平分别为(0.47  $\pm$  0.03)和(0.26  $\pm$  0.02),与对照组及假手术组比较均显著升高( $P < 0.001$ ),假手术组与对照组比较差异无统计学意义( $P_1=0.066, P_2=0.258$ ),其中  $\beta$ -actin 扩增产物长度为 445 bp,GSK-3 $\beta$  扩增产物长度为 158 bp。见图 1-3。

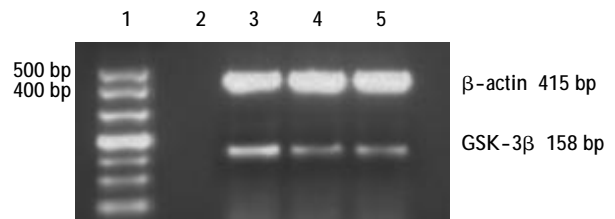
### 2.5 Western blot 法测定肝脏与骨骼肌 GSK-3 $\beta$ 表达水平结果

运用 Western blot 法检测肝脏与骨骼肌 GSK-3 $\beta$  表达水平结果显示,实验组大鼠肝脏与骨骼肌



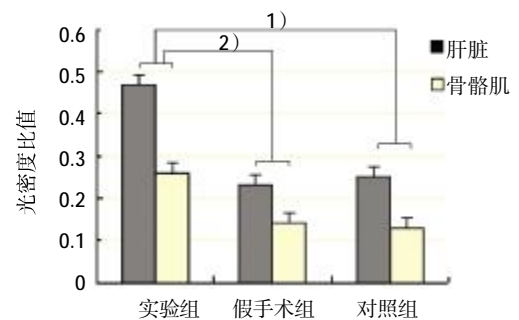
1:DNA marker;2:未加 cDNA 模板的空白对照;3:实验组;4:假手术组;5:对照组

图 1 肝脏 GSK-3 $\beta$  mRNA 的表达



1:DNA marker;2:未加 cDNA 模板的空白对照;3:实验组;4:假手术组;5:对照组

图 2 骨骼肌 GSK-3 $\beta$  mRNA 的表达



1)实验组与对照组比较, $P < 0.01$ ;2)实验组与假手术组比较, $P < 0.01$

图 3 肝脏与骨骼肌 GSK-3 $\beta$  mRNA 的表达情况

GSK-3 $\beta$  表达水平分别为(0.47  $\pm$  0.04)和(0.26  $\pm$  0.03), 与假手术组和对照组比较均明显升高( $P < 0.001$ ), 而假手术组与对照组比较差异无统计学意义( $P_1=0.466, P_2=0.542$ ), 其中  $\beta$ -actin 分子量为 43 kD、GSK-3 $\beta$  分子量为 46 kD。见图 4-6。

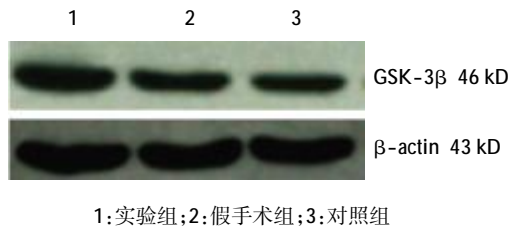


图 4 肝脏 GSK-3 $\beta$  的表达水平

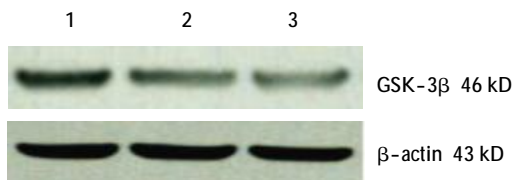
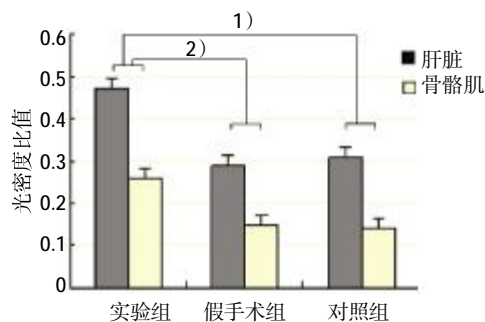


图 5 骨骼肌 GSK-3 $\beta$  的表达水平



1) 实验组与对照组比较,  $P < 0.01$ ; 2) 实验组与假手术组比较,  $P < 0.01$

图 6 肝脏与骨骼肌 GSK-3 $\beta$  的表达情况

### 3 讨论

随着人口老龄化进展加快, AD 严重威胁人类的健康, 据统计截止到 2010 年, 我国 AD 患者已达到 569 万<sup>[4]</sup>。近年来越来越多研究表明<sup>[5]</sup>, AD 与糖尿病具有复杂的相互关系。目前, 糖尿病可促进 AD 的发生、发展已渐渐被人们所认可, 但 AD 是否可以引起外周血糖水平的异常尚不清楚。SCHULINGKAMP 等<sup>[6]</sup>研究发现, 大脑的一些结构如海马、额叶皮质等也可合成并分泌胰岛素, 大脑内的胰岛素可以调节血糖的水平、食物的摄入、体重等。RIVERA 等<sup>[7]</sup>认为, AD 患者大脑额叶组织中胰岛素水平降低。李钦

云等<sup>[8]</sup>通过 126 例 AD 患者研究发现, AD 患者存在血糖水平升高以及胰岛素抵抗。有国内学者发现<sup>[9]</sup>, PD 患者认知功能障碍和病情程度可能与血糖水平没有明显的关系, 可能与多因素影响血糖水平有关, 具体机制有待研究。本研究通过大鼠海马注射 A $\beta$  1-42 构建认知障碍模型, 采用血糖仪检测大鼠 FPG 水平, 结果显示, 实验组大鼠 FPG 水平与假手术组和对照组比较显著升高( $P < 0.05$ ), 提示大鼠认知功能障碍可能会引起血糖水平升高。

大脑海马不仅是参与学习记忆相关的重要结构, 而且其与周围一些脑组织具有广泛的神经纤维联系, 例如海马与下丘脑室旁核(PVN)之间具有直接的神经联系, 下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴(HPA 轴)的激活点位于 PVN, HPA 轴是神经内分泌途径的主要传出通路。有报道, 损伤海马的结构如腹侧下脚可增加糖皮质激素的释放<sup>[10]</sup>。由此可知, 海马可参与神经内分泌的调节。XU 等<sup>[11]</sup>研究发现, 海马可以通过神经通路参与胃动力的调节。刘梅等<sup>[12]</sup>通过对 SD 大鼠海马内微量注射胃动素发现大鼠十二指肠消化间期移行性复合肌电活动发生了显著性的变化, 但是当切断膈下迷走神经后海马对十二指肠消化间期移行性复合肌电活动的影响几乎消失, 因此, 海马可能会通过海马-下丘脑-脑干-迷走神经通路调节胃肠道的运动。

GSK-3 $\beta$  是一种丝氨酸 / 苏氨酸激酶, 不仅是糖代谢的关键酶, 并且参与胰岛素信号通路的调节, GSK-3 $\beta$  可以通过抑制 GS 的生物活性, 从而降低肝(肌)糖原的合成, 导致血糖水平升高。本研究通过运用 RT-PCR 法与 Western blot 法检测大鼠肝脏与骨骼肌 GSK-3 $\beta$  mRNA 与 GSK-3 $\beta$  的表达水平发现, 实验组大鼠肝脏与骨骼肌 GSK-3 $\beta$  表达水平与假手术组和对照组比较, 均显著升高( $P < 0.05$ ), 提示认知障碍大鼠血糖水平的升高可能与肝脏和骨骼肌 GSK-3 $\beta$  表达水平升高有关。也有研究表明<sup>[13]</sup>, AD 患者大脑内 GSK-3 $\beta$  水平及活性显著升高。海马作为大脑边缘系统的重要组成部分可能通过自主神经参与机体调节<sup>[12]</sup>。推测认知障碍大鼠可能由于海马神经元受损导致其肝脏与骨骼肌 GSK-3 $\beta$  表达升高, 进而引起血糖水平的上升。认知障碍大鼠出现血糖升高的机制复杂, GSK-3 $\beta$  作为调控糖代谢的关键酶, 其表达水平的升高可为海马作为中枢神经系统的一个重要组成部分参与糖代谢调节提供新的依据。

## 参 考 文 献:

- [1] LESTER-COLL N, RIVERA E J, SOSCIA S J, et al. Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: relevance to sporadic Alzheimer's disease[J]. *J Alzheimers Dis*, 2006, 9(1): 13-33.
- [2] BEKKERING P L, JAFRI I, VAN OVERVELD F J, et al. The intricate association between gut microbiota and development of type 1, type 2 and type 3 diabetes[J], 2013, 9(11): 1031-1041.
- [3] BIESSELS G J, STAEKENBORG S, BRUNNER E, et al. Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review [J]. *Lancet Neurol*, 2006, 5(1): 64-74.
- [4] CHAN K Y, WANG W, WU J J, et al. Epidemiology of Alzheimer's disease and other forms of dementia in China, 1990-2010: a systematic review and analysis[J]. *Lancet*, 2013, 381(9882): 2016-2023.
- [5] LI X H, SONG D L, LENG S X. Link between type 2 diabetes and Alzheimer's disease: from epidemiology to mechanism and treatment[J]. *Clin Interv Aging*, 2015, 10: 549-560.
- [6] SCHULINGKAMP R J, PAGANO T C, HUNG D, et al. Insulin receptors and insulin action in the brain review and clinical implications[J]. *Neu Rosei Biobehan Rec*, 2000, 24(8): 855-872.
- [7] RIVERA E J, GOLDIN A, FULMER N, et al. Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine[J]. *J Alzheimers Dis*, 2005, 8(3): 247-268.
- [8] 李钦云,陈峥,张守宇,等. 126 例阿尔茨海默病患者血脂代谢和胰岛素抵抗的研究[J]. *中华全科医学*, 2015, 13(1): 15-17.
- [9] 黄静,张玉虎,聂坤,等. 帕金森病认知功能障碍及病情程度与血糖水平的关系[J]. *临床神经病学杂志*, 2014, 27(2): 81-83.
- [10] HERMAN J P, OSTRANDER M M, MUELLER N K, et al. Limbic system mechanisms of stress regulation, hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2005, 29(8): 1201-1213.
- [11] XU L L, GONG Y, WANG H, et al. The stimulating effect of ghrelin on gastric motility and firing activity of gastric-distension-sensitive hippocampal neurons and its underlying regulation by the hypothalamus[J]. *Exp Physiol*, 2014, 99(1): 123-135.
- [12] 刘梅,董蕾,朱文艺,等. 大鼠海马区微量注射胃动素对十二指肠移动性复合肌电活动的影响[J]. *第一军医大学学报*, 2005, 25: 955-958.
- [13] 苏亚楠,陈立强,张晓波,等. 山茱萸多糖对阿尔茨海默病模型大鼠 GSK-3 $\beta$  和磷酸化 GSK-3 $\beta$  的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2013, 33(9): 2092-2094.

(张蕾 编辑)