

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.06.004

川陈皮素对糖尿病大鼠海马 Nrf-2 表达及认知功能的影响

张红蕊^{1,2}, 赵轶群¹, 高晓红¹, 刘春梅¹, 李春霞¹, 郑佳^{3△}(1. 河北省唐山市人民医院体检中心 063000; 2. 华北理工大学研究生院, 河北唐山 063000;
3. 唐山职业技术学院临床医学系, 河北唐山 063000)

[摘要] 目的 探讨川陈皮素(NOBI)对糖尿病认知功能的改善作用及可能机制。方法 实验大鼠均为雄性,分为正常组:12周龄 Wistar 大鼠 8 只,清洁级,正常饲料喂养;糖尿病组:12周龄 GK 大鼠 8 只,SPF 级,正常饲料喂养;NOBI 组:12周龄 GK 大鼠 6 只,SPF 级,正常饲料喂养,同时每天给予 NOBI 10 mg/kg 灌胃 8 周。喂养到 22 周龄时, Morris 水迷宫行为学实验评估大鼠认知功能、免疫组织化学和 Western blot 检测海马中核因子 E2 相关因子 2(Nrf-2)的表达水平。结果 与正常组相比,糖尿病组潜逃潜伏期延长($P<0.05$),NOBI 组潜逃潜伏期较糖尿病组缩短($P<0.05$)。平台撤走后,与正常组相比,糖尿病组在目标象限停留时间较短($P<0.05$),NOBI 组较糖尿病组延长($P<0.05$)。与正常组相比,糖尿病组 Nrf-2 的表达增加($P<0.05$);与糖尿病组相比,NOBI 组 Nrf-2 的表达水平上升($P<0.05$)。结论 NOBI 可以升高海马 Nrf-2 表达水平,改善糖尿病大鼠认知功能障碍,提示可能与增强 Nrf-2 活性及激活抗氧化应激通路有关。

[关键词] 川陈皮素;神经元;海马;氧化应激;核因子 E2 相关因子 2**[中图分类号]** R285.5**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)06-0732-03

The influence of hobiletin on the cognitive impairment of diabetic rats and the expression of Nrf-2 in hippocampus

Zhang Hongrui^{1,2}, Zhao Yiqun¹, Gao Xiaohong¹, Liu Chunmei¹, Li Chunxia¹, Zheng Jia^{3△}

(1. Department of Physical Examination, Tangshan People's Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China;

2. Postgraduate College, North China University and Technology, Tangshan, Hebei 063000, China;

3. Department of Clinical Medicine, Tangshan Vocational Technical College, Tangshan Hebei, 06300, China)

[Abstract] **Objective** To explore the Hobiletin improving cognitive function and the possible mechanism to protect the hippocampal neurons. **Methods** Eight of Wistar rats, SPF, 12 weeks of age, male, were set to the normal group; Eight of GK male rats, SPF, 12 weeks of age, only for diabetes group; Both of the two groups were given the normal feed. 6 of GK male rats, 12 weeks of age, to feed Hobiletin of orange peel 10 mg/kg and lavage for 8 weeks, were set to the NOBI group. After 22 weeks the rats were tested by Morris water maze behavior experiment for test the ability of learning and memory; the expression of Nrf-2 was detected by immunohistochemistry and Western Blot. **Results** Compared with the normal group, the incubation period of diabetes group was longer ($P<0.05$), and the escape latency of NOBI group was shorter than that of diabetes group ($P<0.05$). Compared with the normal group, the residence time in the target quadrant was shorter in the diabetes group ($P<0.05$), and prolonged in the NOBI group than in the diabetes model group ($P<0.05$). The expression of Nrf-2 in diabetes group was significantly higher than that in diabetes group ($P<0.05$). The expression of Nrf-2 in NOBI group was significantly higher than that in diabetes group ($P<0.05$). **Conclusion** NOBI can increase the expression of Nrf-2 in hippocampus and improve the cognitive function of diabetic rats, which may be related to the enhancement of Nrf-2 activity and the activation of anti-oxidative stress pathway.

[Key words] hobiletin; neurons; hippocampus; oxidative stress; Nrf-2

糖尿病认知功能障碍(diabetes mellitus with cognitive impairment, DMCI)是糖尿病严重的并发症,而如何预防和改善 DMCI,近年来成为研究热点。目前公认为氧化应激造成脑损伤是其重要发病机制之一。机体内源性抗氧化应激通路核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor E2-related factor 2, Nrf-2)-ARE 信号通路可激活以减轻脑损害。Nrf-2 是通路中重要的抗氧化转录因子,通过与 ARE 的作用,产生大量的抗氧化酶及Ⅱ相解毒酶,抵消活性氧簇(ROS)的作用。川陈皮素(hobiletin, NOBI)主要在中药陈皮中提取,在柑橘类水果的果皮中广泛存在,是多甲氧基黄酮类化合物,具有抗氧化^[1]、抗动脉硬化^[2]、抗炎、降糖、保肝^[3]、营养神经等作用。本文旨在通过研究 NOBI 改善糖尿病大鼠 DMCI 及对海马 Nrf-2 表达的影响,探索 NOBI 改善 DMCI 的机制及防治 DMCI 的有效方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物 12 周龄 GK 大鼠,清洁级,体质量(300±20)

g; 12 周龄 Wistar 大鼠,清洁级,体质量(300±20)g。所有实验大鼠均为雄性。GK 大鼠购自北京维通利华公司,许可证号 SCXK(京)2012-0001。Wistar 大鼠由华北理工大学动物实验中心提供。严格按照华北理工大学动物实验伦理委员会的条例执行。

1.2 主要药物及试剂 NOBI 由陕西慧科生物科技有限公司生产,兔抗 Nrf-2 多克隆抗体由美国 KPL 公司生产,β-actin 抗体和免疫组织化学试剂盒由北京中衫金桥生产,十二烷基硫酸钠(SDS)凝胶试剂盒由碧云天生物科技研究所提供,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)电泳液粉剂抗体稀释液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒由北京艾德莱生物科技有限公司提供。

1.3 仪器设备 Morris 水迷宫及分析软件由中科院药研所研发,电泳转移槽和垂直电泳仪由北京六一仪器厂提供,FluorChen 5500 凝胶成像分析系统由美国 Thermo 提供, XMOOLDR-MLM 温控摇床、高速低温离心机、体质量秤由

北京中西远大提供。

1.4 方法

1.4.1 实验分组 为适应环境,早期喂养大鼠 2 周后,检测 GK 大鼠空腹血糖均大于 11.1 mmol/L,按随机数字表法分为糖尿病组;GK 大鼠 8 只,给予正常饲料;NOB 组;GK 大鼠 6 只,给予正常饲料喂养,同时每天给予 NOB 10 mg/kg 灌胃;正常组;Wistar 大鼠 8 只,食用正常饲料。均喂养 8 周。

1.4.2 Morris 水迷宫实验 大鼠 22 周龄时,行 Morris 水迷宫实验,由实验室固定人员完成,并不了解大鼠分组情况。(1)定位航行能力测试:确保周围环境安静的情况下进行连续 4 d 的测试,第 1 天为适应性训练。水池为圆形,高 50 cm,直径 214 cm,水深 30 cm,水温约 20℃,把 4 个标记点放池壁上,分成 4 个象限,把圆形平台放到一个象限的中央。动物面朝池壁入水,记录爬上平台的时间,即潜逃潜伏期。若在 120 s 内未上台,潜逃潜伏期则记录为 120 s。轮流测试,共进行 4 轮,计算平均值作为当天成绩。比较潜逃潜伏期的长短,代表大鼠空间学习能力水平;(2)空间探索能力测试:第 5 天把圆形平台取出,记录 120 s 内大鼠在目标象限停留多长时间。

1.4.3 灌注取材 Morris 水迷宫实验结束后大鼠空腹过夜 8 h。之后每组选取 4 只大鼠进行心脏灌注,予 10% 的水合氯醛(3.0 mL/kg)行腹腔注射麻醉,开胸使心脏暴露,行左心室插管,同时将右心耳剪开,用生理盐水灌注,至眼球肝脏变白时,以 4% 中性多聚甲醛灌注固定,快速将脑组织完整取出,并迅速分离海马组织,装到冻存管,用液氮冷冻后,放置于-80℃冰箱储存。

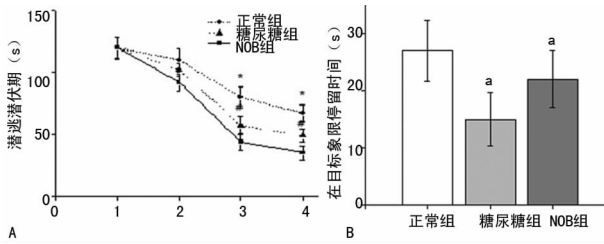
1.4.4 免疫组织化学检测 将分离的海马组织在 4%多聚甲醛中固定 1 d。用石蜡包被、切片,约 5 μm 厚。脱蜡至水化后,用 3% H₂O₂ 室温处理 20 min。在正常血清中封闭反应 1 h。在 4℃冰箱条件下兔抗 Nrf-2(1:500)孵育过夜,滴加二抗(已生物素化),37℃孵育 40 min。镜下观察,自来水冲洗,充分漂洗后,中性树胶封片,显微镜下观察。用 Kodak 图像分析系统和 Image-Proplus 软件,在 400 倍光镜下每张切片选 5 个视野,计算细胞数,并取平均值作为结果。

1.4.5 Western blot 检测 制备蛋白样品,将 RIPA 裂解液加到各组样本中,充分裂解样本,用高速低温离心机离心后取出上清液。严格按照 BCA 法对蛋白的浓度进行测定。加好蛋白样品后,恒压电泳,直到溴酚蓝到凝胶底部时结束。使用半干转法把蛋白转移到硝酸纤维素膜上。取出膜后,用 3% BSA-TBST 封闭,用摇床摇洗 60 min。将 1:1 000 稀释的一抗加入,在 4℃摇床上过夜,TBST 漂洗。将稀释的二抗加入,室温下置摇床上孵育 60 min,TBST 漂洗。膜上加 ECL 后反应大约 5 min。曝光胶片,显影、定影。使用凝胶成像分析系统对条带进行分析。

1.5 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件行统计学处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 描述,两两样本比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Morris 水迷宫实验结果 第 1 天适应性训练期后,与正常组相比,糖尿病组大鼠潜逃潜伏期有所延长(*P* < 0.05);NOB 组较糖尿病组潜逃潜伏期缩短(*P* < 0.05)。平台撤走后,与正常组相比,糖尿病组在目标象限停留时间缩短(*P* < 0.05);与糖尿病组相比,NOB 组停留时间延长(*P* < 0.05)。表明糖尿病大鼠学习记忆能力、空间探索能力均下降,出现认知障碍;而在 NOB 治疗后改善,提示 NOB 在剂量为 10 mg/kg 时对糖尿病大鼠 DMCI 有改善作用,见图 1。

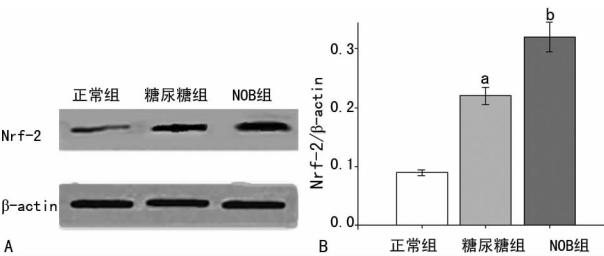


A:定位航行能力测试中各组大鼠连续 4 d 的潜伏潜逃期;B:平台撤走后各组大鼠在目标象限的停留时间。^a:*P* < 0.05,与正常组比较。

图 1 NOB 治疗增强糖尿病大鼠的学习记忆能力

2.2 免疫组织化学结果显示 光镜下可见在阳性细胞的细胞质中出现棕黄色颗粒,各组均有阳性表达的细胞。与正常对照组(6.25 ± 2.11)比较,糖尿病组(15.34 ± 3.34)海马 CA1 区 Nrf-2 的阳性表达数目明显增多(*P* < 0.01)。与糖尿病组相比,NOB 组(20.38 ± 3.27)海马 CA1 区 Nrf-2 的阳性细胞数显著增多(*P* < 0.01)。

2.3 Western blot 检测结果 正常组海马 Nrf-2 低水平表达,糖尿病组较正常组增加(*P* < 0.05);NOB 组较糖尿病组海马 Nrf-2 的表达升高(*P* < 0.05),表明 NOB 治疗后 Nrf-2 表达增加,抗氧化能力随之增强。见图 2。



A:各组大鼠海马 Nrf-2 表达;B:各组大鼠海马 Nrf-2 表达水平分析图。^a:*P* < 0.05,与正常组比较;^b:*P* < 0.05,与糖尿病组比较。

图 2 NOB 治疗增加糖尿病大鼠海马 Nrf-2 的表达

3 讨 论

海马与认知功能相关,有研究显示糖尿病大鼠出现认知功能障碍时海马结构受损,考虑与高血糖透过血脑屏障损伤海马神经元有关。近年来很多学者认为氧化应激是 DMCI 发病的机制之一。氧化应激作用使细胞氧化-抗氧化的稳态失去平衡,ROS 增多而产生细胞毒性,损害脑组织。为抗衡氧化应激的破坏作用,机体自身内源性抗氧化应激通路激活,如 Nrf2-ARE 信号通路,发挥重要的抗氧化作用。

Nrf-2 属于 CNC 家族,是家族中活性最强的转录因子。在正常情况下,Nrf-2 被细胞质中 Keap1 锚定,其活性相对抑制;Keap1 对氧化还原非常敏感,有氧化应激时与 Nrf-2 解离,使其进入细胞核,在核内与抗氧化反应元件(antioxidant response element,ARE)作用,启动下游抗氧化蛋白,增强解毒酶系的表达等,如 γ 谷氨酰半胱氨酸合成酶(γ-glutamylcysteine synthetase,γ-GCS)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)、醌氧化还原酶(NADPH:quinone oxidoreductase 1,NQO1)等,清除大量的自由基,减轻细胞损伤^[4],而且通过下调胶质细胞的活化介导对神经元的保护作用^[5]。有研究发现在阿尔茨海默病中 Nrf-2 表达量升高,表明 Nrf-2 水平及活性升高可以起到保护中枢神经的作用。有报道糖尿病大鼠 DMCI 时海马中 Nrf-2 表达量升高,与本研究得出的结果一致。

NOB 属于多甲氧基黄酮类化合物,化学结构为 5,6,7,8,3',4'-六甲氧基黄酮(5,6,7,8,3',4'-A'-hexamethoxy flavone),

是从芸香科植物枳橘中提取出来的中药单体,有抗癌、抗血小板聚集、抗炎、抗氧化等作用。近期发现 NOB 可通过降低 p38 丝裂原活化蛋白激酶的活性水平而抑制皮肤黑色素瘤的细胞增殖^[6];NOB 还有抗组胺的作用^[7],NOB 可改善阿尔茨海默病模型大鼠的认知功能^[8],有效改善脑缺血导致的认知功能下降。也有研究提出在实验性脑梗死大鼠中 9 mg/kg NOB 对其脑组织有保护作用,也可预防脑卒中^[9],故本实验选用 NOB 10 mg/kg 的剂量研究其对糖尿病认知作用是否也有所改善。

本研究得出 Nrf2 在正常组大鼠海马中即有少量表达,考虑是用来维持正常情况下的生理功能。与正常组相比,糖尿病组大鼠海马中 Nrf-2 的表达水平升高,但是认知功能明显下降,提示在脑内高血糖环境下,对氧化应激敏感的 Keap1 即释放 Nrf-2 入细胞核,Nrf-2 活性增强、表达量增加,启动下游抗氧化蛋白等表达(如 γ -GCS、SOD、NQO1 等),中和大量氧化应激产物、神经毒素等,以保护海马神经元,但是仍然不能抵抗高血糖导致的氧化应激状态,所以海马的损伤使大鼠出现认知功能障碍。而经过 NOB 治疗的糖尿病大鼠认知功能有所改善,海马中 Nrf-2 表达水平较糖尿病组显著增高,笔者推测 NOB 是 Nrf-2 的激活剂,可以诱导 Nrf-2 活性增强、表达量增加,从而产生更多的抗氧化蛋白等保护海马结构,激活 Nrf2-ARE 信号通路的抗氧化作用。NOB 对糖尿病大鼠的 DMCI 有一定的治疗作用。

在本研究中,NOB 药物剂量选用 10 mg/kg 治疗,可以提高 DMCI 大鼠海马 Nrf-2 转录活性及表达,Nrf2-ARE 信号通路激活,下游产生大量抗氧化蛋白及解毒酶,中和大量损害神经元的 ROS,从而神经元细胞的药物解毒能力、抗氧化应激的能力都被提高,这对保护海马神经元有重要的作用,可见 NOB 药物剂量是 10 mg/kg 时海马 Nrf-2 表达增加,改善了 DMCI。如果 NOB 药物剂量继续增大,如 20 mg/kg、30 mg/kg 或更多时,NOB 治疗对 DMCI 的作用如何呢?在正常细胞严格限制 Nrf-2 表达,除了氧化还原途径外,还有不依赖氧化还原反应的途径,如磷酸化途径;另外,Nrf-2 表达量增加也有不良影响,如 Nrf-2 在肿瘤组织中高表达易导致其预后不良,有报道发现 Nrf-2 持续高表达有致死性作用。综合以上,所以笔者推测 Nrf-2 表达在一定范围内随着 NOB 药物剂量的增加而增高,但当到达某一药量时即出现平台期,或者 Nrf-2 的持续高表达会造成极不利影响。如何找到这个效果最佳的药量范围,需要今后进一步的研究证实。

NOB 可以提高糖尿病大鼠海马 Nrf-2 表达水平,改善其认知功能。在糖尿病患者中,NOB 在某个合适的剂量是否对改善 DMCI 有此明显的作用,是否可以起到预防作用,这些都需要更多更深入的研究。

(上接第 731 页)

- [11] Luo J,Zhou X,Ge X,et al. Upregulation of Ying yang 1 (YY1) suppresses esophageal squamous cell carcinoma development through heme oxygenase-1[J]. Cancer Sci, 2013,104(11):1544-1551.
- [12] Hu JL,Li ZY,Liu W,et al. Polymorphism in heme oxygenase-1(HO-1) promoter and alcohol are related to the risk of esophageal squamous cell carcinoma on Chinese males[J]. Neoplasma,2010,57(1):86-92.
- [13] Hu JL,Xiao L,Li ZY,et al. Upregulation of HO-1 is ac-

参考文献

- [1] Lu YH,Su MY,Huang HY,et al. Protective effects of the citrus flavanones to PC 12 cells against cytotoxicity induced by hydrogen peroxide[J]. Neurosci Lett,2010,484(1):6-11.
- [2] Mulvihill EE,Assini JM,Lee JK,et al. Nobiletin attenuates VLDL overproduction, dyslipidemia, and atherosclerosis in mice with diet-induced insulin resistance[J]. Diabetes,2011,60(5):1446-1457.
- [3] Akachi T,Shiina Y,Ohishi Y,et al. Hepatoprotective effects of flavonoids from shekwasha(Citrus depressa) against D-galactosamine-induced liver injury in rats[J]. Nutr Sci Vitaminol(Tokyo),2010,56(1):60-67.
- [4] Koriyama Y,Nakayama Y,Matsugo S,et al. Protective effect of lipoic acid against oxidative stress is mediated by Keap1/Nrf2-dependent heme oxygenase-1 induction in the RGC-5 cellline[J]. Brain Res,2013,1499(5):145-157.
- [5] Izumi Y,Matsumura A,Wakita S,et al. Isolation,identification, and biological evaluation of Nrf2-ARE activator from the leaves of green perilla(Perilla frutescens var. crispa f. viridis)[J]. Free Radic Biol Med,2012,53(4):669-679.
- [6] Yamamoto Y,Shioda N,Han F,et al. Nobiletin improves brain ischemia-induced learning and memory deficits through stimulation of CaMK II and CREB phosphorylation[J]. Brain Res,2009(1295):218-229.
- [7] Kim JJ,Korm S,Kim WS,et al. Nobiletin suppresses MMP-9 expression through modulation of p38 MAPK activity in human dermal fibroblasts[J]. Biol Pharm Bull, 2014,37(1):158-163.
- [8] Jang SE,Ryu KR,Park SH,et al. Nobiletin and tangeretin ameliorate scratching behavior in mice by inhibiting the action of histamine and the activation of NF- κ B,AP-1 and p38[J]. Int Immunopharmacol,2013,17(3):502-507.
- [9] Yang EJ,Lim SH,Song KS,et al. Identification of active compounds from Aurantii Immatri Pericarpium attenuating brain injury in a rat model of ischemia-reperfusion[J]. Food Chem,2013,138(1):663-670.

(收稿日期:2016-10-11 修回日期:2016-11-23)

companied by activation of p38MAPK and mTOR in human oesophageal squamous carcinoma cells[J]. Cell Biol Int,2013,37(6):584-592.

- [14] Kim JS,Song HJ,Ko SK,et al. Quercetin-3-O-beta-D-glucuronopyranoside (QGC)-induced HO-1 expression through ERK and PI3K activation in cultured feline esophageal epithelial cells[J]. Fitoterapia,2010,81(2):85-92.

(收稿日期:2016-10-18 修回日期:2016-11-16)