

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2021.01.003

❖ 基础研究 ❖

表没食子儿茶素没食子酸酯对 2 型糖尿病大鼠认知功能的影响及其机制研究

刘行海, 徐策, 买文丽, 郑倩, 刘华, 刘红

(川北医学院生理学教研室, 四川 南充 637000)

【摘要】目的: 研究表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对 2 型糖尿病(T2DM)大鼠认知功能的影响及其机制研究。**方法:** 30 只大鼠中随机选择 8 只作为对照组,另 22 只采用高脂饮食联合链脲佐菌素复制 T2DM,将造模成功的 17 只大鼠随机分成模型组($n=9$)和 EGCG 组($n=8$)。EGCG 组给予 EGCG 灌胃,剂量为 40 mg/kg,1 次/d,对照组和模型组每次灌胃等体积生理盐水,连续 4 周。采用 Morris 水迷宫法评价大鼠认知功能,测定大鼠空腹血糖(FBG)、空腹血清胰岛素(FINS)水平并计算胰岛素敏感指数(ISI),ELISA 检测大鼠海马组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)含量,Western blotting 检测海马组织核因子- κ B p65(NF- κ B p65)蛋白表达。**结果:** 与对照组比较,模型组大鼠逃避潜伏期增加,穿越平台次数减少($P < 0.05$);FBG、FINS 升高,ISI 降低($P < 0.05$);海马 TNF- α 和 IL-6 含量升高,NF- κ B p65 蛋白表达增加($P < 0.05$)。与模型组比较,EGCG 组逃避潜伏期减少,跨越原平台位置次数增加($P < 0.05$);FBG、FINS 降低,ISI 升高($P < 0.05$);海马 TNF- α 和 IL-6 含量降低,NF- κ B p65 蛋白表达减少($P < 0.05$)。**结论:** EGCG 对 T2DM 大鼠认知功能减退有改善作用,其机制可能与抑制 TNF- α ,IL-6 及 NF- κ B p65 蛋白表达,从而减轻海马炎症反应有关。

【关键词】 表没食子儿茶素没食子酸酯;2 型糖尿病大鼠;认知障碍;海马;炎症

【中图分类号】 R587.1 **【文献标志码】** A

Effect of epigallocatechin gallate on cognitive function in type 2 diabetic rats and its mechanism

LIU Xing-hai, XU Ce, MAI Wen-li, ZHENG Qian, LIU Hua, LIU Hong

(Department of Physiology, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China)

【Abstract】Objective: To study the effect of epigallocatechin gallate (EGCG) on cognitive function of type 2 diabetes mellitus (T2DM) rats and its mechanism. **Methods:** 8 of the 30 rats were randomly selected as the control group, and the other 22 rats were induced by high-fat diet and streptozotocin to replicate T2DM. 17 successful rats were randomly divided into model group ($n=9$) and EGCG group ($n=8$). EGCG group was given EGCG by gavage, the dose was 40 mg/kg, once a day, while the control group and model group were given the same volume of normal saline every time for 4 weeks. The cognitive function of rat was evaluated by the morris water maze test. Fasting blood glucose (FBG), fasting serum insulin (FINS) levels were measured and insulin sensitivity index (ISI) was calculated. The contents of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in hippocampus were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and The NF- κ B p65 protein expression in hippocampus was detected by western blotting. **Results:** Compared with control group, the escape latency increased while the number of crossing platform decreased in model group ($P < 0.05$), FBG and FINS increased and ISI decreased in model group ($P < 0.05$). The expression of NF- κ B p65, TNF- α and IL-6 increased in hippocampus in model group ($P < 0.05$). Compared with model group, the escape latency decreased while the number of crossing platform increased in EGCG group ($P < 0.05$), FBG, FINS decreased and ISI increased in EGCG group ($P < 0.05$). The expression of NF- κ B p65, TNF- α and IL-6 decreased in hippocampus in EGCG group ($P < 0.05$). **Conclusion:** EGCG can improve the cognitive decline in T2DM rat and its mechanism may be related to reducing the inflammatory response in hippocampus by inhibiting TNF- α , IL-6 and NF- κ B p65 protein expression.

【Key words】 Epigallocatechin gallate; Type 2 diabetic rat; Cognitive impairment; Hippocampus; Inflammation

认知障碍是 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 的重要慢性并发症,病情加重会进展为痴

呆,从而降低患者生活质量,增加患者病死率,然而其发病机制目前尚未完全明了^[1]。近年来,研究^[2]发现炎症反应参与了T2DM认知障碍的发生发展。表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)作为绿茶主要生物活性成分之一,具有抗氧化、抗凋亡、降血脂及神经保护作用^[3-4]。本研究以海马组织炎症为切入点,观察EGCG对T2DM认知障碍的改善作用是否与抑制肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)及核因子- κ B p65(NF- κ B p65)的表达有关,以期EGCG临床用于T2DM认知障碍防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

30只清洁级雄性Wistar大鼠,体重为(195±16)g,由川北医学院动物中心提供。链脲佐菌素(美国Sigma公司);血清胰岛素检测试剂盒(北京北方生物技术研究所);血糖仪(长沙三诺科技公司);EGCG(上海源叶生物科技有限公司);TNF- α 、IL-6 ELISA试剂盒(美国R&D公司);BCA蛋白检测试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);NF- κ B p65抗体、 β -actin抗体(北京博奥森生物技术有限公司);水迷宫计算机图像实时分析系统(成都泰盟科技有限公司);电泳仪(北京六一仪器厂);酶标仪(美国Thermo公司)。

1.2 方法

1.2.1 T2DM动物模型建立、分组及干预 从30只大鼠中随机分出8只作为对照组,另22只参照文献^[5]方法建模。以空腹血糖(fasting blood glucose, FBG) > 7.8 mmol/L,同时伴有胰岛素敏感指数(insulin sensitivity index, ISI)降低,作为复制T2DM模型成功的判断标准^[6]。实验中实际建模成功17只大鼠,将其随机分成EGCG组($n=8$)和模型组($n=9$)。EGCG组灌胃给EGCG,剂量为40 mg/kg,1次/d,对照组和模型组每次灌胃等体积生理盐水,连续4周。期间各组大鼠常规饲料饲养,自由饮水。

1.2.2 Morris水迷宫法测试认知功能 大鼠干预4周后进行水迷宫实验^[7]:(1)定向航行实验,历时5 d,记录逃避潜伏期,即2 min内寻找平台所需时间;(2)空间探索实验,记录大鼠在2 min内跨越原平台所在位置的次数。

1.2.3 标本采集与指标测定 水迷宫测试实验完成后,空腹12 h,经心脏穿刺采血制备血清标本,保存于-80℃待测。快速断头取脑,冰上分离海马组织,保存于-80℃待测。血糖仪测定FBG;按试剂盒说明书检测FINS水平及海马组织TNF- α 和IL-6含量。

1.2.4 Western blotting检测海马组织NF- κ B p65

蛋白表达 称取海马组织,提取总蛋白,BCA试剂盒测定蛋白浓度,蛋白通过10% SDS-PAGE凝胶电泳分离后,采用半干式转膜法转至PVDF膜,封闭,加入NF- κ B p65一抗(1:300)及 β -actin一抗(1:1000),4℃孵育过夜,用TBST洗涤膜3次,每次10 min,加入二抗(1:3000),室温孵育1 h,用TBST洗涤膜3次,每次10 min。采用化学发光法显色,以 β -actin为内参,image J软件图像分析系统对条带进行灰度分析。NF- κ B p65蛋白的相对表达水平用NF- κ B p65蛋白与内参 β -actin灰度值的比值表示。

1.3 统计学分析

采用SPSS 17.0软件对数据进行分析处理。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况比较

与对照组比较,模型组大鼠具有饮水量增加,食量增加,尿量增加,但是活动却明显减少,反应较迟钝,毛发显晦暗等糖尿病典型症状。在实验进程中,模型组大鼠体重有减少趋势,但上述其它症状和体征更加明显。EGCG组大鼠上述情况均有改善。

2.2 认知功能实验结果比较

与对照组比较,模型组大鼠的逃避潜伏期增加,跨越原平台位置的次数减少($P < 0.05$);与模型组比较,EGCG组大鼠的逃避潜伏期减少,跨越原平台位置的次数增加($P < 0.05$)。见表1。

表1 认知功能实验结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	逃避潜伏期(s)	跨越原平台次数(次)
对照组($n=8$)	35.18±5.87	7.3±1.23
模型组($n=9$)	58.73±4.21*	4.5±1.72*
EGCG组($n=8$)	40.23±3.18#	7.0±3.09#

* $P < 0.05$,与对照组相比;# $P < 0.05$,与模型组相比。

2.3 FBG、FINS和ISI比较

与对照组比较,模型组大鼠的FBG和FINS升高,ISI降低($P < 0.05$);与模型组比较,EGCG组大鼠的FBG和FINS降低,ISI升高($P < 0.05$)。见表2。

表2 FBG、FINS和ISI比较($\bar{x} \pm s$)

组别	FBG(mmol/L)	FINS(mU/L)	ISI
对照组($n=8$)	5.96±0.92	15.58±2.17	-4.58±0.34
模型组($n=9$)	18.34±2.22*	44.68±2.73*	-6.71±0.58*
EGCG组($n=8$)	10.82±1.41#	21.65±3.09#	-5.25±0.73#

* $P < 0.05$,与对照组相比;# $P < 0.05$,与模型组相比。

2.4 海马组织TNF- α 和IL-6含量比较

与对照组比较,模型组大鼠海马TNF- α 和IL-6含量升高($P < 0.05$);与模型组比较,EGCG组大鼠海马TNF- α 和IL-6含量降低($P < 0.05$)。见表3。

表 3 海马 TNF- α 和 IL-6 含量比较 [($\bar{x} \pm s$), pg/mL]

组别	TNF- α	IL-6
对照组 (n = 8)	71.61 \pm 6.84	64.20 \pm 8.24
模型组 (n = 9)	182.90 \pm 5.72 *	157.67 \pm 8.36 *
EGCG 组 (n = 8)	135.42 \pm 7.93 #	116.32 \pm 5.98 #

* P < 0.05, 与对照组相比; #P < 0.05, 与模型组相比。

2.5 海马组织 NF- κ B p65 蛋白表达比较

与对照组比较,模型组大鼠海马 NF- κ B p65 蛋白表达水平升高 (P < 0.05); 与模型组比较,EGCG 组大鼠海马 NF- κ B p65 蛋白表达水平降低 (P < 0.05)。见图 1。

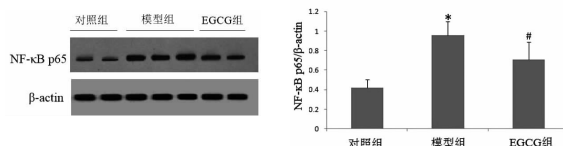


图 1 海马 NF- κ B p65 蛋白表达比较

*P < 0.05, 与对照组相比; #P < 0.05, 与模型组相比。

3 讨论

本课题组既往研究发现,采用高脂饮食联合链脲佐菌素,能复制出临床症状和学习记忆相近的 T2DM 大鼠模型,而给予 EGCG 10 mg/kg、20 mg/kg 和 40 mg/kg 灌胃治疗后,尤其以 40 mg/kg 剂量效果最好。本实验中,模型组大鼠出现了明显的空间学习记忆减退,即逃避潜伏期明显延长,跨越原平台位置次数减少;经 EGCG 40 mg/kg 治疗后的大鼠逃避潜伏期明显缩短,跨越原平台位置次数增多,提示 EGCG 可以改善 T2DM 大鼠空间学习记忆的减退。

脑内炎症反应是 T2DM 认知障碍重要发病机制之一。NF- κ B 是炎症起始的核心调控因子^[8]。有研究^[9]表明,激活的 NF- κ B 转位到细胞核,可诱导多种细胞因子如 TNF- α 、IL-6、细胞粘附分子、C 反应蛋白和趋化因子等的基因表达。国内外研究^[10-11]结果表明,通过抑制 NF- κ B 通路活化可达到抗炎效果。TNF- α 和 IL-6 是体内重要的促炎细胞因子。学习记忆是认知功能的主要方面,而海马组织是学习记忆的重要整合中枢。有研究^[12]报道,海马区中小胶质细胞活化后将产生大量 IL-6、IL-1 β 等炎症因子,导致脑内免疫反应加重及大量细胞死亡,从而进一步损害学习记忆能力。还有研究^[13-15]证实,TNF- α 和 IL-6 在学习记忆能力减退的大鼠海马组织中的表达明显升高,通过减少炎症因子 TNF- α 和 IL-6 的表达可有效改善糖尿病大鼠认知功能。本实验发现,与对照组比较,模型组海马组织活化的 NF- κ B 增加即 NF- κ B p65 亚基蛋白表达增多,炎症因子 TNF- α 和 IL-6 含量升高,也进一步证实 T2DM 大鼠的海马组织存在明显的炎症。给

予 EGCG 治疗后,大鼠海马组织 NF- κ B p65 蛋白表达、炎症因子 TNF- α 和 IL-6 含量均显著低于模型组,提示 EGCG 通过降低海马组织中 NF- κ B 的活化,减少炎症因子 TNF- α 、IL-6 的产生,减轻海马组织炎症反应,进而改善 T2DM 大鼠空间学习记忆能力。

综上所述,EGCG 能明显抑制 T2DM 大鼠海马炎症因子 TNF- α 、IL-6 的产生以及 NF- κ B p65 蛋白表达,并显著改善 T2DM 大鼠空间学习记忆能力,其可能的机制是通过减轻海马炎症反应,从而起到神经保护作用。但 EGCG 对 T2DM 大鼠认知功能的改善可能存在多部位、多途径的作用机制,其具体机制仍有待深入研究。

参考文献

- [1] 刘淑玲,卢言慧,李明子. 2 型糖尿病所致认知功能障碍的研究进展[J]. 重庆医科大学学报,2019,44(4):404-410.
- [2] 王婧,庄朋伟,张艳军. 神经炎症在 2 型糖尿病脑病发病机制中作用的研究进展[J]. 现代药物与临床,2015,30(4):470-474.
- [3] 刘行海,刘红,郑倩,等. EGCG 对 2 型糖尿病大鼠认知障碍影响[J]. 辽宁中医药大学学报,2018,20(4):48-50.
- [4] 吴秋欣,王慧,刘冬梅,等. 表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)抗氧化作用在眼科研究中的应用[J]. 眼科新进展,2019,39(3):287-290.
- [5] 刘华,刘行海,冯乾,等. 戊巴比妥对 2 型糖尿病大鼠模型复制中的应用研究[J]. 川北医学院学报,2014,29(5):425-428.
- [6] Liu H, Cao DY, Liu H, et al. The herbal medicine cordyceps sinensis protects pancreatic beta cells from streptozotocin-induced endoplasmic reticulum stress[J]. Can J Diabetes,2016,40(4):329-335.
- [7] 曾媛,包春容,唐勇,等. 荔枝核提取物对 2 型糖尿病认知障碍的改善[J]. 中成药,2016,38(3):672-676.
- [8] Zhang J, Tan H, Jiang W, et al. Amantadine alleviates postoperative cognitive dysfunction possibly by increasing glial cell line-derived neurotrophic factor in rats[J]. Anesthesiology,2014,121(4):773-785.
- [9] 董银华,王洪新,陈泽峰,等. 糖调节受损大鼠认知障碍及脑组织 NF- κ B p65、TNF- α 的表达[J]. 中风与神经疾病杂志,2014,31(10):891-893.
- [10] 王鹏程,赵珊,冯健,等. 基于 NF- κ B 信号通路的中药抗溃疡性结肠炎研究进展[J]. 中草药,2015,46(10):1556-1561.
- [11] Zusso M, Lunardi V, Franceschini D, et al. Ciprofloxacin and levofloxacin attenuate microglia inflammatory response via TLR4/NF- κ B pathway[J]. Neuroinflammation,2019,16(1):148.
- [12] Hwang IK, Choi JH, Nam SM, et al. Activation of microglia and induction of pro-inflammatory cytokines in the hippocampus of type 2 diabetic rats[J]. Neurol Res,2014,36(9):824-832.
- [13] 刘行海,刘红,郑倩,等. 虫草菌丝对 2 型糖尿病大鼠认知功能障碍的影响[J]. 中国老年学杂志,2019,39(12):3026-3028.
- [14] 吴磊,何滨,魏静,等. 铅和高脂饮食对雌性大鼠学习记忆及海马炎症因子的影响[J]. 中国职业医学,2017,44(2):148-152.
- [15] Wang SB, Jia JP. Oxymatrine attenuates diabetes-associated cognitive deficits in rats[J]. Acta Pharmacol Sin,2014,35(3):331-338.

(收稿日期:2020-05-19)

修回日期:2020-08-15)