

糖尿病大鼠学习记忆损伤的机制及 ω -3 多不饱和脂肪酸的防护作用研究

赵长海

(第四军医大学西京医院临床营养科)



初步结论 有待推进

- 糖尿病儿童患者学习能力降低和成年患者的记忆功能减退已逐渐受到广泛的关注。
- 研究表明糖尿病可引起认知功能障碍,糖尿病患者痴呆和阿尔兹海默病的发病率均明显升高。
- 实验研究也证明链脲菌素诱导的糖尿病大鼠也出现学习记忆功能的损伤。

机制不清 治疗困难

- 目前糖尿病损伤学习记忆能力的机制还不十分清楚,缺乏有效的医学防护措施,给其治疗带来一定的困难。

亟待解决 重大课题

- 因此,进一步研究糖尿病学习记忆损伤的生物学机制,寻求防护措施,减轻其对身体健康的损害,降低其造成的社会资源巨大消耗,是亟待解决的重大课题。

备注: ω -3 多不饱和脂肪酸主要包括二十碳五烯酸 (EPA, C20:5) 和二十二碳六烯酸 (DHA, C22:6), 海鱼中提炼的鱼油DHA与EPA含量丰富, 膳食摄入鱼油是人体补充DHA及EPA的良好途径。

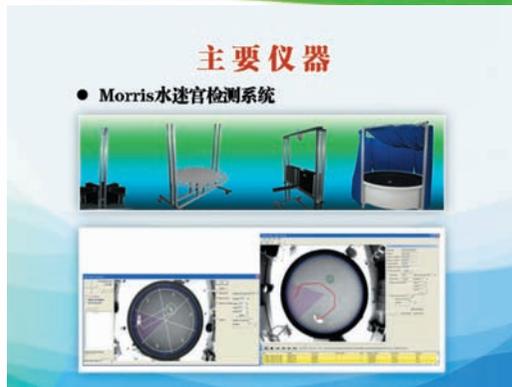


实验研究

- ## 设计四组实验研究
- 糖尿病对大鼠空间学习记忆能力的影响（行为学层面）
 - 糖尿病对大鼠海马神经元凋亡的影响（分子生物学层面）
 - 糖尿病对大鼠海马神经元兴奋性的影响（电生理学层面）
 - ω -3多不饱和脂肪酸对糖尿病海马神经元损伤的防护作用研究

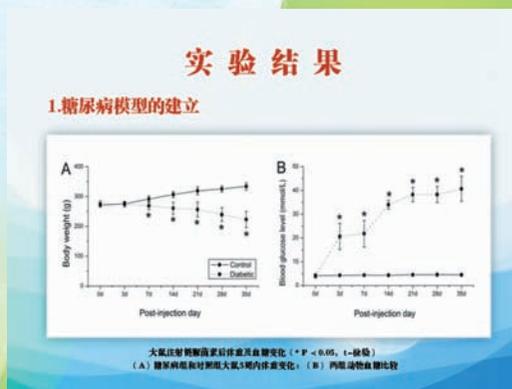
实验一 糖尿病对大鼠 空间学习记忆能力的影响

- ## 实验动物
- 健康成年雄性SD大鼠，清洁级，体重（ 200 ± 10 ）g
 - 由第四军医大学实验动物中心提供
 - 动物在光/暗周期为12 h/12 h、自然光照条件下饲养
 - 自由饮水和进食
- 



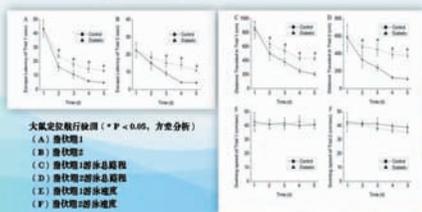
- ## 实验方法
- ◆ 糖尿病动物模型的建立
 - 20只成年雄性SD大鼠，按体重随机分为对照组和糖尿病组
 - 动物房中适应性饲养5天
 - 链脲菌素（STZ, Sigma）60mg/kg 腹腔注射
 - 观察动物“三多一少”表现（多饮，多食，多尿，体重下降）
 - 3天后检测血糖水平，血糖水平超过16.7 mmol/L为建模成功
 - 对照组大鼠腹腔注射生理盐水
 - ◆ Morris水迷宫的检测

- ## 统计学分析
- ◆ 应用 SPSS13.0 软件进行统计分析
 - 大鼠定位航行实验潜伏期、探索路程和平均速度用方差分析进行比较
 - 空间搜索实验中象限停留时间百分比用卡方检验
 - 平台穿梭次数进行t-检验
- 



实验结果

2. Morris水迷宫定位航行的检测



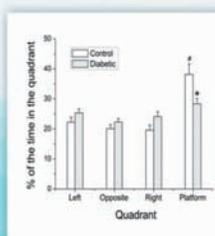
大鼠定位航行检测 (*P < 0.05, 方差分析)

- (A) 潜伏期
- (B) 潜伏期
- (C) 潜伏期1游水总路程
- (D) 潜伏期2游水总路程
- (E) 潜伏期1游水次数
- (F) 潜伏期2游水次数

随着训练次数的增加,两组大鼠均趋向于在平台的位置搜索,并且游水路程越来越短,搜索平台所用时间越来越少,对照组大鼠在四个象限中停留的时间分布的总趋势相同,糖尿病大鼠潜伏期1和潜伏期2均较对照组大鼠明显延长,具有显著性统计学意义(P < 0.05)。

实验结果

3. 空间搜索能力检测



- 在180s的空间搜索过程中,对照组大鼠在目标象限停留时间明显高于其他象限,糖尿病大鼠在四个象限停留时间大致相同,在目标象限停留时间明显低于对照组(P < 0.05)。
- 与对照组(4.9 ± 0.6次)相比,糖尿病大鼠平台穿越次数(2.6 ± 0.3次)明显降低(P < 0.05)。

对照组糖尿病大鼠占象限停留时间百分比比较 *P < 0.05, 方差分析

讨论

- Morris水迷宫是测试动物空间记忆能力公认的行为学测试手段。
- 用每个入水点的第1次训练成绩来衡量空间参考记忆的水平。
- 用第2次训练成绩来衡量空间工作记忆的水平。
- 大鼠在每个入水点第1次探索时,由于时间和空间的改变,不能与上一次探索之间形成顺序性关系,大鼠只能依照环境的参照来确定水下平台的位置,其记忆属性为参考记忆。
- 大鼠在每个入水点第2次探索时,与第1次探索在空间和时间上都存在连续性,大鼠可以根据刚刚获得的信息找到水下平台,其记忆属性为工作记忆。

讨论

- 本实验定位航行实验的结果显示,通过训练,大鼠的逃避潜伏期越来越短,说明大鼠具有通过训练获得空间记忆的能力。
- 糖尿病组大鼠潜伏期1大于对照组(P < 0.05),而大鼠游泳速度没有明显差异,说明糖尿病未引起大鼠体力耐力的明显降低,因此潜伏期1的延长主要与其学习记忆能力有关。
- 另外,糖尿病组大鼠潜伏期2所用时间和探索路程均较对照组增加(P < 0.05),说明糖尿病造成大鼠工作记忆能力的降低。

讨论

- 在第二次探索实验中,糖尿病组大鼠的游泳速度有稍许减慢,但是与对照组相比没有显著性差异,说明其潜伏期的延长主要是记忆能力降低的结果。
- 空间搜索实验的结果显示:对照组大鼠在平台所在象限停留时间明显高于其他象限,糖尿病大鼠则没有明显差别,两组穿越平台次数也有显著性差异,说明糖尿病大鼠记忆能力的减退。

实验二

糖尿病对大鼠 海马神经元凋亡的影响

前言

海马是介导应激反应的最重要的脑区之一,也是参与学习和记忆的关键脑区和应激激素作用的主要脑区,海马既能调节应激反应,又受到应激反应的影响。

为此我们深入研究糖尿病状态下大鼠海马神经元形态学的变化。

实验材料



- 健康成年雌性SD大鼠,清洁级,体重(200 ± 10)g



- TUNEL检测试剂盒……等



- 配液……略



实验方法

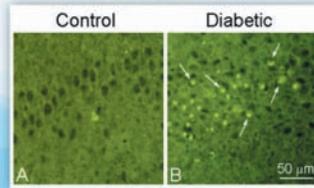
◆ 动物分组及建模

- 30只SD雄性大鼠被随机分为对照组和糖尿病组，每组15只。
- 糖尿病组大鼠腹腔注射链脲菌素，对照组腹腔注射生理盐水。

实验结果

2.糖尿病引起海马神经元凋亡

(2) 电镜下神经元超微结构的变化



TUNEL染色显示，对照组海马CA1区未见凋亡细胞，糖尿病大鼠海马CA1区出现大量凋亡细胞。

实验方法

制备海马电镜标本

Western-Blot法检测蛋白表达水平

Bax Cyt-c Bcl-2 Caspase-3

尼氏染色

TUNEL染色

免疫组织化学染色

制备大鼠全脑冰冻切片

实验结果

3.糖尿病诱导海马神经元Bax、Caspase-3、Cyt-c高表达



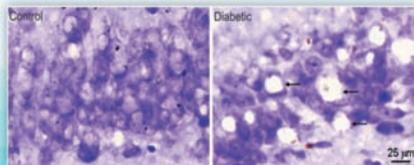
与对照组相比，糖尿病大鼠海马Bax、Cyt-c和Caspase-3表达量显著增加；Bcl-2表达量无明显变化。

Bax和Cyt-c蛋白表达在电镜标本制备的分布情况。(* P < 0.05, 1-标称)
A.电镜标本中Bax表达水平在糖尿病大鼠海马增高，Cyt-c则相反；糖尿病大鼠海马Bcl-2表达量降低。
B.电镜标本中Bax在糖尿病海马降低，而Cyt-c则明显增加。

实验结果

1.大鼠海马CA1区锥体细胞形态变化

(1) 尼氏染色光镜下神经元形态变化



海马CA1区神经元光镜下改变(Nissl染色)，箭头所示为糖尿病大鼠海马CA1层的空隙。

尼氏染色可见，对照组大鼠海马CA1区锥体细胞排列紧密，有突起，核大而圆，核仁清晰；神经元胞体内尼氏体丰富，呈块状或颗粒状。糖尿病大鼠海马神经元排列松散，核仁不清，尼氏体减少，胞浆染色，核变小，不规则，成碎片，核后常出现大量空隙。

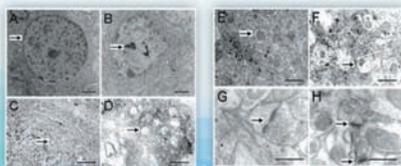
讨论

- 空间学习记忆的形成和巩固依赖于海马的活动和功能，正常的海马神经元形态对海马解剖结构和生理功能的维持至关重要。
- 研究表明糖尿病可引起血管病变和神经传导速度的变化，进而影响突触可塑性，许多研究显示神经元的退行性变和凋亡在多种中枢神经系统疾病引起的学习记忆障碍中起着重要的作用。

实验结果

1.大鼠海马CA1区锥体细胞形态变化

(2) 电镜下海马CA1区锥体神经元超微结构的变化



A. 正常锥体神经元
B. 糖尿病大鼠海马锥体神经元胞浆内颗粒状染色
C. 正常线粒体
D. 糖尿病大鼠神经元线粒体肿胀，嵴排列紊乱，基线，有的呈空泡样变

E. 正常神经纤维束
F. 糖尿病大鼠神经元轴突内颗粒状染色，本轴突
G. 正常神经纤维束的突触
H. 糖尿病大鼠突触间隙增宽

讨论

- 本研究结果显示，糖尿病大鼠海马CA1区锥体细胞排列紊乱，尼氏小体明显减少。尼氏小体是细胞合成蛋白质的场所，它的结构正常与否能够反映细胞的功能状态，尼氏小体的减少提示锥体神经元功能的异常。
- 透射电镜观察结果显示糖尿病大鼠海马CA1区锥体神经元轴突水肿，线粒体肿胀、嵴断裂，发生空泡样变。
- 这些超微结构的变化提示神经元的功能状态的损伤，这可能是糖尿病影响学习记忆能力的细胞基础。

讨论

- 线粒体是能量供应的中心，也是神经元维持正常生理功能的重要细胞器，正常情况下葡萄糖等能源物质进入细胞后，在线粒体中经一系列酶的作用参与三羧酸循环，经过氧化磷酸化最终生成ATP。
- 因此线粒体超微结构的变化可直接导致细胞能量代谢的改变，使ATP的合成量减少，引起细胞内外离子平衡失调，细胞内钙积累，介导海马神经元的凋亡过程。

讨论

- Cyt-c是线粒体呼吸链中的一个基本成分，定位于线粒体内膜上，被认为是哺乳动物细胞凋亡信号传导过程的关键因素。
- 研究发现将Cyt-c注入细胞中，可诱导细胞凋亡。
- 从胞浆中去除Cyt-c可减轻凋亡。
- 当线粒体受损后，线粒体上的通透性转换孔开放，导致线粒体内的Cyt-c释放入胞浆，激活细胞凋亡的级联反应，引起神经元的凋亡。
- 本实验结果显示，海马神经元Cyt-c表达量增加，且发生了从线粒体到胞浆的转移，说明线粒体损伤后Cyt-c释放入胞浆，参与了糖尿病海马神经元的凋亡过程。



实验三

糖尿病对大鼠 海马神经元兴奋性的影响

前言

神经元作为脑内单个的功能活动单位，神经系统功能需通过神经元的活动而完成，基因表达、蛋白水平或化学物质等引起的功能效应最终需通过神经元的活动特性改变而实现，因此，研究神经元本质特征的改变可以在一定程度上综合考虑各种因素引起的神经元功能损伤。

实验材料

- 健康成年雄性SD大鼠，清洁级，体重(200 ± 10) g

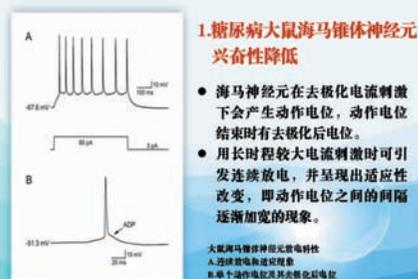


- 配液……略

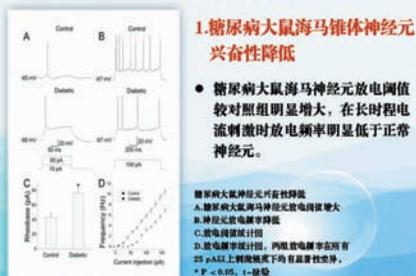
实验方法

- ◆ 动物分组
 - 50只SD雄性大鼠随机分为对照组和糖尿病组，每组25只。
 - 糖尿病组大鼠腹腔注射链脲菌素。
 - 对照组腹腔注射生理盐水。
- ◆ 脑片膜片钳全细胞记录
- ◆ 制作海马脑片

实验结果

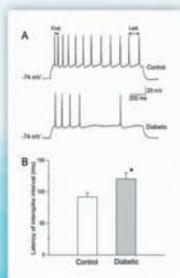


实验结果





实验结果

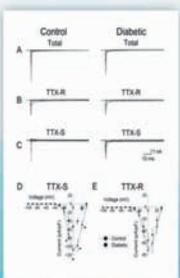


1.糖尿病大鼠海马神经元兴奋性降低

- 神经元重复放电的适应性也比正常神经元出现早。

糖尿病大鼠海马神经元重复放电适应性增强
A. 两组动物神经元引发的重复放电
B. 首次动作电位间隔时间数据统计图
* P < 0.05, t-检验

实验结果



2.糖尿病大鼠神经元兴奋性降低的电流机制

- 电压钳模式下记录显示，糖尿病大鼠海马神经元TTX-敏感的钠电流明显降低，而钾电流较对照组增大，两种电流激活时的电流-电压曲线没有明显变化。

海马神经元电流的变化
A. 正常和糖尿病大鼠海马神经元电流记录图
B. TTX敏感条件下记录TTX-不敏感电流
C. A与B相减得到的TTX-敏感电流
D. TTX-敏感电流的电流-电压曲线统计图
E. TTX-不敏感电流的电流-电压曲线统计图
* P < 0.05, 方差分析

讨论

- 糖尿病影响学习记忆的机制研究多集中于糖尿病对血管系统和突触可塑性的研究，对神经元本身的性质关注较少，曾有报道STZ诱导的糖尿病大鼠在2-3周内其神经元膜电位没有明显变化，在本实验中，我们发现STZ诱导大鼠糖尿病5周后，海马神经元的放电阈值增大而放电频率减小，说明糖尿病引起了海马神经元兴奋性降低。
- 研究表明，海马神经元兴奋性的维持在学习记忆中起着重要的作用，因此，我们的实验结果表明糖尿病大鼠海马神经元兴奋性的降低从参与了其学习记忆能力的减退。

讨论

- 为了进一步研究糖尿病大鼠海马神经元兴奋性降低的机制，我们用全细胞膜片钳记录方法分析了神经元的钠电流和钾电流的变化。
- 结果显示，糖尿病大鼠海马神经元钠电流减小而钾电流显著增加。
- 钠电流与动作电位的阈值大小有关，而钾电流也参与调节神经元的兴奋性，曾有研究报道海马锥体神经元的钾电流变化与学习记忆功能有关。
- 我们的研究结果在一定程度上说明钠电流和钾电流均参与了神经元兴奋性的调节，进而影响动物的学习记忆功能，但其机制需要进一步的研究。

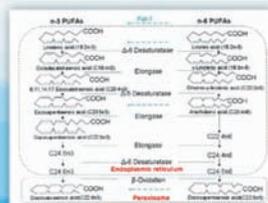


实验四

ω-3多不饱和脂肪酸对糖尿病海马神经元损伤的防护作用研究

前言

本研究通过膳食添加ω-3多不饱和脂肪酸的方式观察ω-3多不饱和脂肪酸对糖尿病大鼠学习记忆的作用，并探讨其可能的机制。



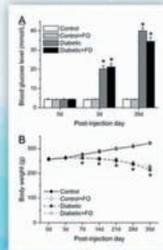
实验材料



- 100只SD雄性大鼠随机分为四组，每组25只，分别为：
 1. 对照组：常规基础饲料饲养，腹腔注射生理盐水
 2. 糖尿病组：常规基础饲料饲养，腹腔注射链脲菌素
 3. 鱼油组：含鱼油饲料饲养，腹腔注射生理盐水
 4. 糖尿病鱼油组：含鱼油饲料饲养，腹腔注射链脲菌素
- 含鱼油饲料为在基础饲料中添加4%鱼油
- 在STZ注射前一周开始给予不同饲料，直至实验结束即STZ注射后5周

实验结果

1.膳食添加鱼油对糖尿病大鼠血糖和体重的影响

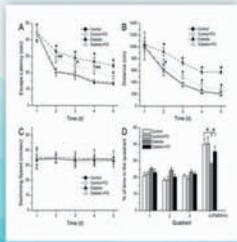


- 与对照组相比，糖尿病组大鼠出现血糖升高和体重下降，无论是正常大鼠还是糖尿病大鼠，鱼油处理都没有明显影响大鼠的血糖和体重。

膳食添加鱼油不影响糖尿病大鼠的血糖水平和体重
A. 各组大鼠血糖水平比较，糖尿病大鼠血糖升高，鱼油对血糖水平没有影响
B. 各组大鼠体重变化，糖尿病大鼠出现明显体重下降
* P < 0.05, t-检验

实验结果

2. 膳食添加鱼油对糖尿病大鼠学习记忆能力的影响



●与糖尿病组相比，膳食添加鱼油的糖尿病大鼠逃避潜伏期明显缩短 (A, $P < 0.05$)，但是没有达到正常对照组水平；空间搜索实验结果显示膳食添加鱼油明显增加了糖尿病大鼠在目标象限的停留时间 (D, $P < 0.05$)。

膳食添加鱼油提高糖尿病大鼠的学习记忆能力

A. 各组大鼠逃避潜伏期的比较，高血糖组明显短于糖尿病大鼠组

B. 各组大鼠游泳距离的比较

C. 各组大鼠游泳速度没有显著性差异

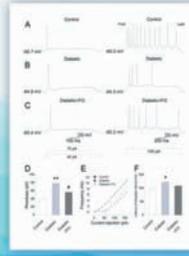
D. 各组大鼠在空间搜索实验中不同象限停留时间的比较

* 与对照组相比 $P < 0.05$, 方差分析

与糖尿病组相比 $P < 0.05$, t-检验

实验结果

5. 膳食添加鱼油增加糖尿病大鼠海马神经元的兴奋性



鱼油干预对糖尿病大鼠海马神经元兴奋性的影响

A. 正常大鼠海马神经元的动作电位和重复放电

B. 糖尿病大鼠海马神经元的动作电位和重复放电

C. 膳食添加鱼油的糖尿病大鼠海马神经元的动作电位和重复放电

D. 动作电位阈值的比较

E. 重复放电阈值的比较

F. 重复放电速度的比较

* 与对照组相比 $P < 0.05$

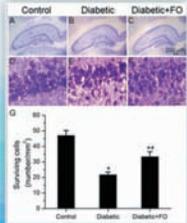
与糖尿病组相比 $P < 0.05$, t-检验

膜片钳记录结果显示，膳食添加鱼油降低了糖尿病大鼠海马神经元的放电阈值，增大了其放电频率。

实验结果

3. 膳食添加鱼油对糖尿病大鼠海马神经元形态的影响

(1) 光镜下形态学变化



尼氏染色观察海马神经元的形态变化

A-C. 各组大鼠的海马结构

D-F. 高血糖下观察各组大鼠海马CA1区神经元形态

G. 海马CA1区存活神经元计数分析

* 与对照组相比 $P < 0.05$

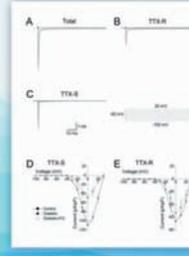
与糖尿病组相比 $P < 0.05$, t-检验

尼氏染色可见正常海马神经元数量多，排列整齐。糖尿病大鼠海马神经元数量减少，尤其是CA1区神经元数量减少。鱼油添加明显增加了糖尿病大鼠海马神经元数量，改善了海马的结构 (A-C)。

高血糖下糖尿病大鼠CA1区神经元总长度明显缩短。鱼油添加也明显改善了神经元的形态，改善了神经元的存活状态 (D-F)。

实验结果

5. 膳食添加鱼油增加糖尿病大鼠海马神经元的兴奋性



鱼油对糖尿病大鼠海马神经元电特性的影响。

A. 海马神经元电特性记录图

B. TTX重复条件下记录TTX-不敏感膜电流

C. A93766抑制的TTX-敏感膜电流

D. TTX-敏感膜电流的电压-电流曲线统计图

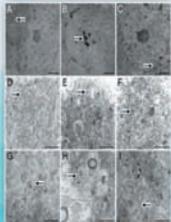
E. TTX-不敏感膜电流的电压-电流曲线统计图

膜片钳记录结果显示，鱼油干预对糖尿病大鼠海马神经元电特性没有影响。

实验结果

3. 膳食添加鱼油对糖尿病大鼠海马神经元形态的影响

(2) 电镜下形态学变化



●电镜下可见膳食添加鱼油明显改善海马神经元的超微结构，减轻了线粒体和轴突的水肿现象。

膳食添加鱼油减轻糖尿病大鼠海马神经元的凋亡

A. 正常对照组海马CA1区神经元

B. 糖尿病大鼠海马CA1区神经元

C. 添加鱼油的正常大鼠海马CA1区神经元

D. 膳食添加鱼油明显减少了糖尿病大鼠海马CA1区神经元的数量

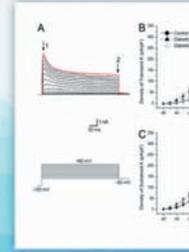
E. TUNEL染色阳性神经元密度分析

* 与对照组相比 $P < 0.05$

与糖尿病组相比 $P < 0.05$, 方差分析

实验结果

5. 膳食添加鱼油增加糖尿病大鼠海马神经元的兴奋性



鱼油对糖尿病大鼠海马神经元电特性的影响

A. 海马神经元电特性记录图

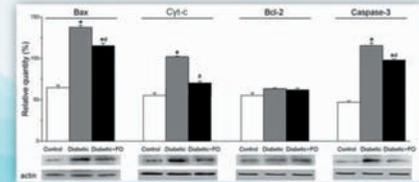
B. 膜电导密度的比较

C. 持续性膜电导密度的比较

膜片钳记录结果显示，明显减小了神经元膜电导密度的程度。

实验结果

4. 鱼油对糖尿病大鼠海马神经元Bax、Cyt-c、Caspase-3表达水平的影响



各组大鼠海马神经元Bax、Cyt-c、Bcl-2、Caspase-3蛋白表达水平。* 与对照组相比 $P < 0.05$ # 与糖尿病组相比 $P < 0.05$, t-检验

与糖尿病组相比，膳食添加鱼油大鼠海马Bax、Cyt-c和Caspase-3蛋白表达量显著降低；Bax和Caspase-3蛋白表达量高于正常对照组；Cyt-c蛋白表达量降低到与正常对照组大鼠相似的水平；Bcl-2蛋白表达量没有显著性的变化。

小结

关于四组实验研究



讨论

本实验以雄性SD大鼠为研究对象，以链脲菌素诱导法建立I型糖尿病模型，研究糖尿病对学习记忆能力的影响及其可能的机制，观察膳食补充鱼油是否能够通过改善海马神经元结构和功能增强糖尿病大鼠的学习记忆能力。

实验结果如下：

讨论

1. 链脲菌素诱导的I型糖尿病大鼠出现空间学习记忆能力的降低。
2. 糖尿病引起大鼠海马神经元数量减少，CA1区锥体神经元超微结构的改变和凋亡的发生，凋亡相关蛋白表达增高，这可能是糖尿病影响学习记忆能力的细胞学基础。
3. 糖尿病大鼠海马锥体神经元的钠电流降低和钾电流增加，使海马神经元兴奋性降低，这可能是糖尿病影响学习记忆能力的功能学基础。
4. 膳食添加富含 ω -3PUFAs的鱼油能够起到减轻糖尿病大鼠的学习记忆能力损伤，其机制可能与改善海马神经元的存活状态，减少神经元凋亡和增加神经元兴奋性有关。



发表论文



《Effects of dietary fish oil on learning function and apoptosis of hippocampal pyramidal neurons in streptozotocin-diabetic rats》

Brain Res. 2012; 1457:33-43.

IF (2012) =2.623



谢谢!

赵长海 副主任医师、副教授
第四军医大学西京医院临床营养科主任
13193336688
laohai800@qq.com