

不同鼠龄在慢性间断性缺氧相关认知损害中的作用及机制探讨

王方 黄朝云 徐敏

【摘要】 目的 阐明不同鼠龄在慢性间断性缺氧相关认知损害中的作用及可能机制。**方法** 采用改良的 IH 鼠箱建立慢性 IH 小鼠模型,利用 Morris 水迷宫检测青年和老年 IH 小鼠的认知功能;通过氧疗的干预对比青年与老年小鼠认知损害及突触可塑性的改善程度,TUNEL 法检测小鼠海马 CA1 区神经元凋亡情况,Western Blotting 检测神经突触素、胰岛素信号通路蛋白[蛋白激酶 B(Akt)、糖原合成激酶 3 β (GSK-3 β)]的磷酸化表达水平变化。**结果** 老年小鼠 IH 组的逃避潜伏期最长,其海马 CA1 区见明显增多的 TUNEL 染色阳性细胞,脑细胞凋亡率最高($P<0.01$),p-Akt、p-GSK3 β 表达水平显著降低($P<0.01$),目标象限 LD 滞留时间与 p-Akt、p-GSK3 β 均存在正相关。**结论** 老年使慢性间断性缺氧 C57BL/6 小鼠认知损害的易感性增加,可能的机制之一是调节胰岛素信号通路相关蛋白的表达异常。

【关键词】 老年 间断性缺氧 认知损害 胰岛素信号转导通路

【中图分类号】 R742 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2017)03-0208-06

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2017.03.010

The role of aging related cognitive impairment and mechanism in chronic intermittent hypoxia Wang Fang, Huang Chaoyun, Xu Min. Department of Neurlogy, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071

【Abstract】 Objective To explore the role of aging related cognitive impairment and the possible mechanism in chronic intermittent hypoxia. **Methods** A improved mice cage was used to set up the chronic intermittent hypoxia mice model, then the Morris water maze tested cognitive function of young and aged mice during chronic intermittent hypoxia. By oxygen therapy intervention, the degree of improvement of cognitive impairment and the synaptic plasticity was compared between young and aged mice. The apoptosis of neurons in mice hippocampus CA1 area was examined by TUNEL, and the expression level of synaptophysin, phosphorylated Akt (p-Akt) and phosphorylated GSK3 β (p-GSK3 β) proteins was examined by Western Blotting. **Results** In the aged group, the escape latency was significantly prolonged compared with the other groups, while the time of swimming in the platform quadrant significantly decreased ($P<0.05$), and the apoptosis rate of hippocampus neural increased ($P<0.01$), while the phosphorylated Akt (p-Akt) and phosphorylated GSK3 β (p-GSK3 β) proteins expression level was significantly reduced ($P<0.01$). There was a linear relationship between the p-Akt expression and time in target quadrant LD, as well as a linear relationship between the the p-GSK3 β and time in target quadrant LD. **Conclusion** It was proposed that the aged could lead to susceptibility to intermittent hypoxia-induced cognitive impairment, and a possible mechanism was the regulating insulin signaling pathway related proteins expression.

【Key words】 Ageing Chronic intermittent hypoxia Cognitive impairment Insulin signaling pathway

睡眠呼吸障碍(sleep-disordered breathing, SDB)是睡眠过程中反复间断地出现呼吸暂停或低通气的临床综合征,慢性间断性缺氧(intermittent hypoxia, IH)是其重要的病理生理基础。研究显

示,睡眠呼吸障碍的患者会出现不同程度的认知损害,涉及空间学习和记忆能力、执行功能、注意力和警觉性等^[1]。睡眠呼吸障碍患者存在糖代谢异常,且二者之间存在重要的联系^[2]。

老年是痴呆发生发展重要的易感因素,已有的研究表明老年在年龄相关的认知损害中有关键作用。最新的流行病学数据显示,中国老年人群的睡

眠呼吸障碍患病率明显升高^[3],由于人口结构的变化,医生面临着数量快速增加的老年睡眠呼吸障碍患者^[4]。目前尚不完全明确老年人脑组织的各种病理学改变是否参与或促进睡眠呼吸障碍相关认知损害的进程。近年来,糖代谢机制在年龄相关的认知损害中的作用备受关注。有研究显示能量限制对糖代谢的改善,抑制氧化应激及炎症反应,可以调节脑组织对年龄相关疾病、脑损伤、神经元变性疾病的易感性^[5];糖代谢异常患者发生痴呆的风险增加^[6],糖尿病加快认知损害的发生和脑组织中淀粉样蛋白沉积的进程,而胰岛素抵抗与脑组织中淀粉样蛋白以及认知损害明显相关。糖代谢机制是否对老年调节间断性缺氧相关认知损害的易感性有影响尚有待研究。本实验通过建立慢性间断性缺氧的动物模型,观察慢性间断性缺氧对青年与老年小鼠认知功能的影响,对比氧疗后青年与老年小鼠的认知功能、突触可塑性及胰岛素介导的信号转导通路蛋白的变化,探讨糖代谢机制在老年调节慢性间断性缺氧相关认知损害中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物 健康青年及老年雄性 SPF 级 C57BL/6 小鼠各 12 只(由第三军医大学动物中心提供),青年小鼠取 2 月龄,体重(18 ± 2)g,老年小鼠取 8~10 月龄,体重(35 ± 5)g。置于动物房中的 IH 鼠箱内饲养,实验过程中给予充足的食物和水。

1.2 造模 将小鼠分为 4 组:青年小鼠 IH-30d 组(A 组,6 只)、青年小鼠 IH-30 d + O₂ (14 d) 组(B 组,6 只)、老年小鼠 IH-30 d 组(C 组,6 只)、老年小鼠 IH-30d + O₂ (14 d) 组(D 组,6 只)。4 组小鼠 06:00AM~18:00PM 饲养于参照王璋、Fagan KA 等^[7-8]方法改进的 IH 鼠箱内,压缩空气在电磁阀控制下分别以 3.8 L/min 的流速输入该鼠箱,每个缺氧-复氧循环中复氧时间为 38 s、每个循环周期为 4 min,每天间歇缺氧 12 h、常氧气体浓度 21%、最低氧气体浓度 10%、缺氧时间 30 d;饲养室室温($22 \sim 24$)℃,相对湿度 50%~60%,12 h 明暗交替光照,缺氧过程中小鼠活动自由,不进食水。

1.3 Morris 水迷宫实验 参照 Bromley 等^[9]总结的方法进行,水迷宫为直径 120 cm,高 60 cm 的圆形水池,水深 32 cm,水温保持 $22 \sim 26$ ℃;池壁标有东南西北 4 个入水点,以池底圆心为中心将迷宫等分为 4 个象限,分别称 LU、RU、LD 及 RD 象限;在

LD 象限正中离池壁 30 cm 处放 1 个直径 8 cm,高 30 cm 站台,水池上方安装有摄像机,同步记录小鼠的运动轨迹;连续 5 d 的训练中每天训练 3 次,每次训练间隔 30 min,将小鼠头朝池壁放入水中,放入位置随机取东、西、南、北 4 个起始位置之一,记录逃避潜伏期(s)、游泳距离(m)等指标;若 60 s 仍不能找到站台,则将其引导至平台并在平台上停留 20 s,潜伏期记为 60 s;训练期结束后撤除平台,将小鼠由 RU 象限放入水中,观察并记录小鼠的游泳速度及 60 s 内在 LD 象限滞留时间,每只小鼠检测 1 次;通过 ANY-maze 动物行为学分析软件分析,得到实验数据。

1.4 取材 Morris 水迷宫结束第 2 d 用 7% 水合氯醛(0.005 mL/g)腹腔注射麻醉小鼠,每组中各取 3 只小鼠用 4% 多聚甲醛心脏灌注,断头取脑,冰上分离海马,以 4% 多聚甲醛固定,行脱水、透明、石蜡包埋、切片(片厚 5 μ m)处理,用于 TUNEL 检测;每组中剩余的 3 只小鼠断头取脑,分离海马,冰 PBS 洗净后将组织置入于 -80 ℃ 冰箱存放,用于 Western blotting 检测。

1.5 TUNEL 检测 TUNEL 染色技术检测切片海马 CA1 区神经细胞凋亡;每组从不同小鼠中随机选取 6 张切片,在 200 倍光镜下随机选取 5 个不重叠的视野,采用 Image Pro Plus 6.0 软件分析计算凋亡细胞数和总细胞数;以细胞核中呈棕黄色着色者为阳性细胞,凋亡指数 AI(Apoptosis Index) = 凋亡细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。

1.6 Western blotting 检测 取出冷冻的海马组织,冰上操作剪切组织,加入 RIPA 裂解液,制备海马组织匀浆,4 ℃ 12 000 r/min 低温离心 5 min,取上清,用 BCA 法测定蛋白浓度,SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白样品,转膜,5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,一抗 4 ℃ 孵育过夜,二抗室温孵育 1.5 h,ECL 曝光,凝胶图像扫描分析系统采图、分析。内参为 GAPDH。

1.7 统计学处理 所有数据均以均数 \pm 标准差 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Graph Pad Prism 5.0 软件进行 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Morris 水迷宫测试

2.1.1 Morris 水迷宫学习成绩 在连续 5 d 的训练中老年小鼠 IH 组的逃避潜伏期明显长于青年小

鼠 IH 组,4 组中老年小鼠 IH 组逃避潜伏期最长($P<0.05$);复氧后青年小鼠 IH 后复氧组和老年小鼠 IH 后复氧组的逃避潜伏期明显缩短($P<0.05$)(图 1)。

2.1.2 Morris 水迷宫记忆成绩 在第 6 d 空间探索测试中青年小鼠 IH 组和老年小鼠 IH 组在目标象限滞时间显著减少,4 组中老年小鼠 IH 组在目标象限滞时间最少($P<0.05$),复氧后青年小鼠 IH 后复氧组和老年小鼠 IH 后复氧组在目标象限滞时间显著延长($P<0.05$)(图 2)。

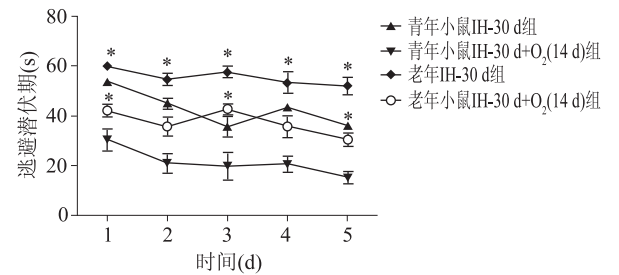


图 1 小鼠逃避潜伏期 与青年组比较, * $P<0.05$

2.2 TUNEL 检测 老年小鼠 IH 组、青年小鼠 IH 组海马 CA1 区细胞均可见增多的 TUNEL 染色阳性细胞,4 组中老年小鼠 IH 组阳性细胞最多;复氧后青年小鼠 IH 后复氧组、老年小鼠 IH 后复氧组阳

性细胞数显著减少,其凋亡指数均有差异明显($P<0.01$)(图 3~4)。

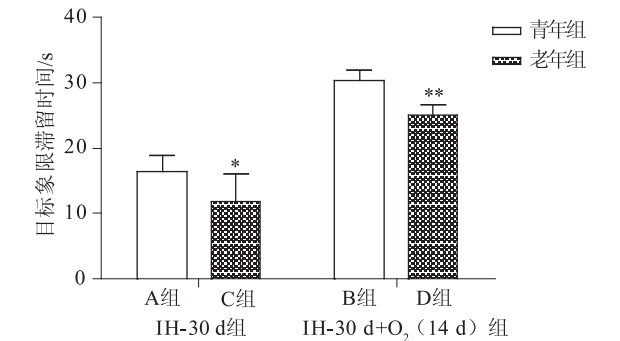


图 2 小鼠在目标象限滞留时间 与青年组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

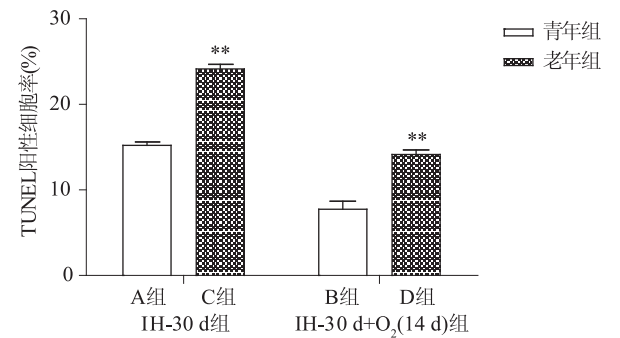
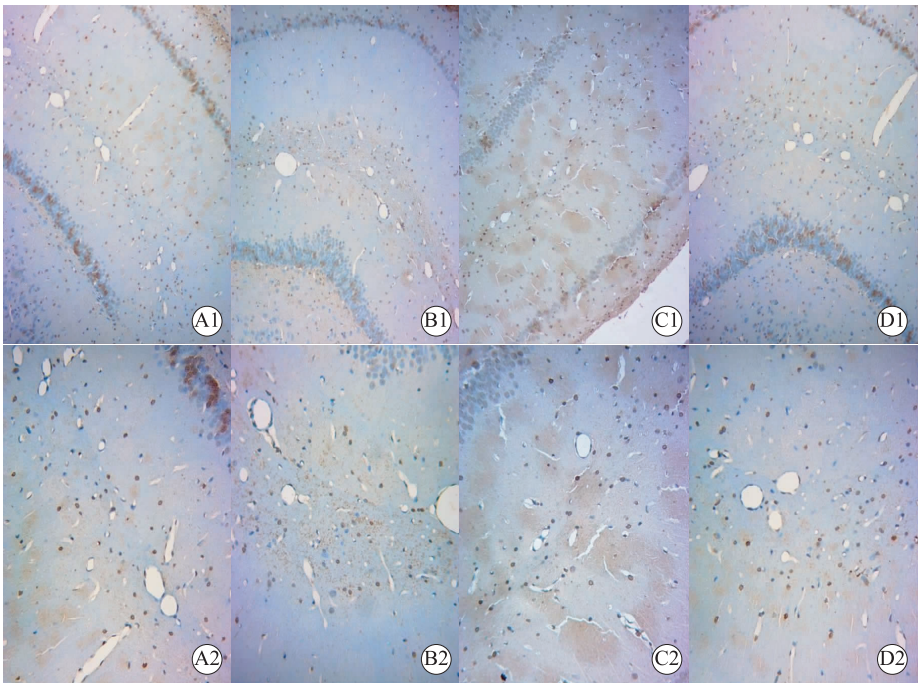


图 4 TUNEL 阳性细胞率 与青年组比较, ** $P<0.01$



A1、B1、C1、D1($\times 100$ 倍);A2、B2、C2、D2($\times 200$ 倍);A 组为青年小鼠 IH-30 d;B 组为青年小鼠 IH-30 d + O₂ (14 d);C 组为老年小鼠 IH-30 d;D 组为老年小鼠 IH-30 d + O₂ (14 d)

图 3 小鼠海马 CA1 区神经细胞的凋亡细胞检测(TUNEL 法)

2.3 Western Blotting 检测

2.3.1 SYP Western Blotting 检测 老年小鼠 IH 组海马 CA1 区中 SYP 蛋白表达水平较青年小鼠 IH 组显著降低($P<0.01$);复氧后老年小鼠 IH 后复氧组 SYP 蛋白表达水平较青年小鼠 IH 后复氧组显著降低($P<0.01$)(图 5)。

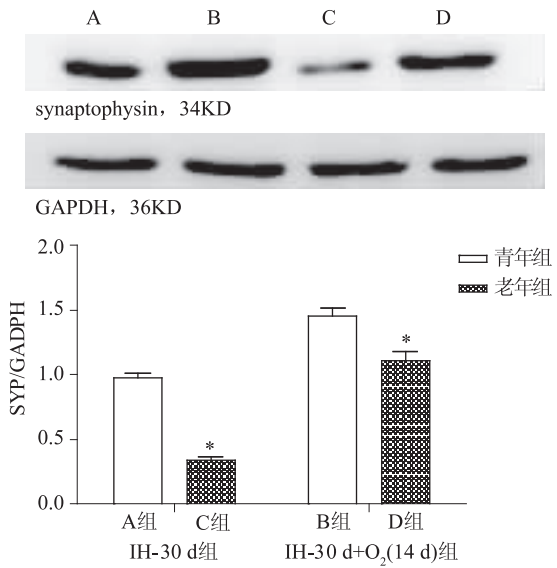


图 5 不同鼠龄对 IH 小鼠 SYP 水平的影响与青年组比较,* $P<0.01$

2.3.2 p-Akt、p-GSK3 β Western Blotting 检测 老年小鼠 IH 组海马 CA1 区中 p-Akt、p-GSK3 β 蛋白表达水平较青年小鼠 IH 组显著降低($P<0.01$);复氧后老年小鼠 IH 后复氧组 p-Akt、p-GSK3 β 蛋白表达水平较青年小鼠 IH 后复氧组显著降低($P<0.01$)(图 6~7)。

2.3.3 行为学测试指标与 p-Akt、p-GSK3 β 蛋白表达水平之间的相关性分析 4 组小鼠海马 CA1 区中 p-Akt ($r = 0.954$, $P<0.01$)、p-GSK3 β ($r = 0.962$, $P<0.01$)蛋白表达水平与其在目标象限 LD 中的滞留时间呈正相关(图 8~9)。

3 讨论

睡眠呼吸障碍以睡眠期的慢性间断性缺氧、深睡眠减少、夜间反复觉醒为特征,其与认知损害的相关性已得到实验证实,但 SDB 相关认知损害的机制尚未完全阐明。老年是痴呆发生发展重要的易感因素,影像学研究显示年龄相关的认知损害与脑组织的体积缩减、脑白质密度降低有关^[10-11],伴随海马与皮层神经元密度下降、神经元突触可塑性受损^[12-13]。

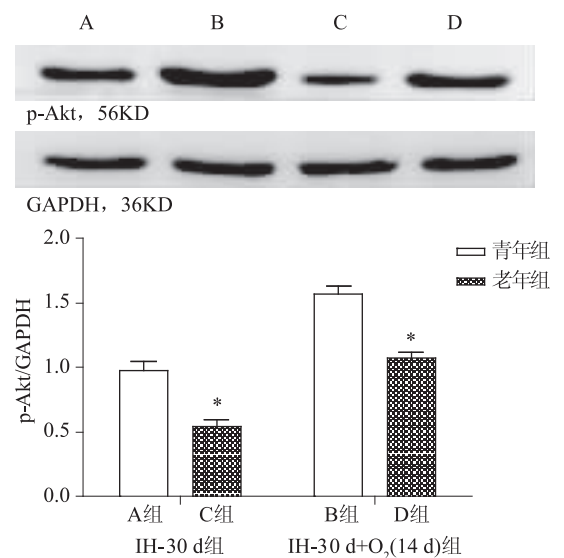


图 6 不同鼠龄对 IH 小鼠 Akt 磷酸化水平的影响与青年组比较,* $P<0.01$

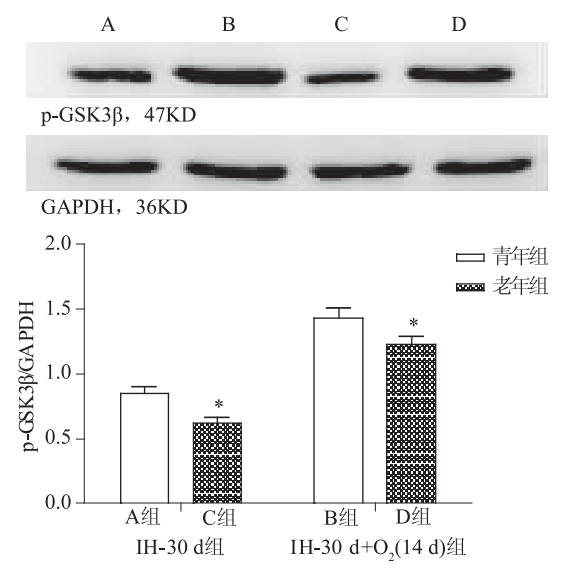


图 7 不同鼠龄对 IH 小鼠 GSK3 β 磷酸化水平的影响与青年组比较,* $P<0.01$

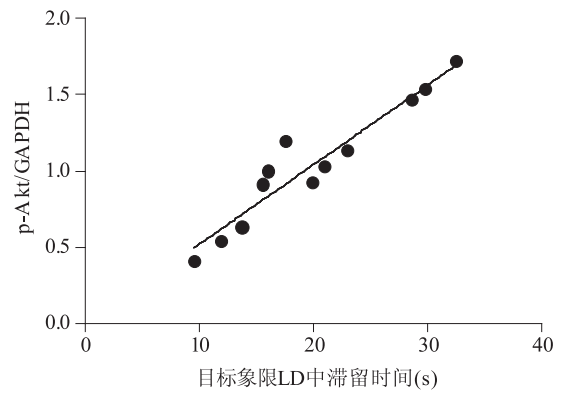


图 8 目标象限 LD 中滞留时间与 p-Akt 蛋白表达水平的关系

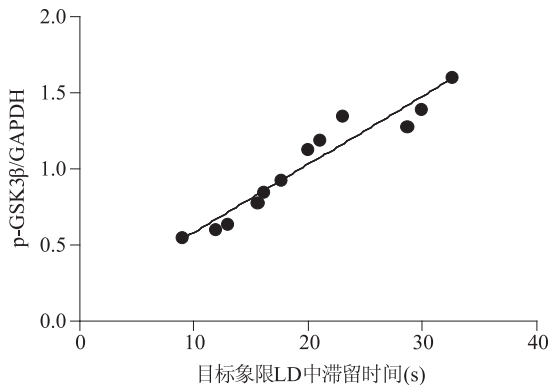


图9 目标象限LD中滞留时间与 p-GSK3β 蛋白表达水平的关系

本研究以 IH 环境中的青年及老年小鼠为研究目标,发现老年使慢性间断性缺氧 C57BL/6 小鼠认知损害的易感性增加,伴有胰岛素信号通路相关蛋白表达异常。

SDB 和认知障碍在老年人中虽很常见,但很少有研究涉及老年与青年、中年 SDB 患者对认知功能影响之间的对比,SDB 与年龄对认知的影响之间是否存在协同作用未知尚可^[14]。有研究指出,间歇性缺氧引起的系统性症状可能与年龄、控制呼吸的化学物质及神经网络共同作用有关,且经过持续的正压通气治疗后认知功能得到改善^[15]。本研究的行为学测试中老年 IH 组小鼠较青年 IH 组潜伏期长,学习记忆时间长,认知功能损害明显;复氧治疗后老年 IH 组较青年 IH 组潜伏期延长,学习记忆时间长,认知功能改善程度弱。海马 CA1 区是影响学习记忆的重要解剖结构,其突触可塑性的变化可间接反映了学习与记忆。有研究指出,间歇性缺氧导致的细胞凋亡可能是睡眠呼吸暂停相关认知障碍的一个重要因素^[16]。本实验中老年 IH 小鼠海马 CA1 区神经细胞凋亡较青年 IH 组明显;复氧治疗后老年小鼠海马 CA1 区神经细胞凋亡有所减少,但仍高于青年小鼠,其学习记忆功能低于青年小鼠。这说明老年可能间接促进了 IH 的细胞凋亡,进而影响认知功能。有研究表明,原儿茶酸(PCA)通过减轻细胞凋亡、提高 SYP 的表达水平,改善 IH 诱导 SD 大鼠的认知障碍^[17]。本研究结果显示,与青年小鼠 IH 组比较,老年小鼠 IH 组突触素蛋白表达水平显著降低,认知损害明显。

IH 诱导认知损害的易感性主要受遗传和环境两方面因素的影响,如 APOE4 的等位基因可能增加老年人 IH 相关认知功能障碍的易感性^[14];糖代

谢异常可使 IH 大鼠的神经元可塑性受损,从而削弱其对 IH 诱导的认知损害的耐受程度^[18]。有研究指出,胰岛素介导的信号通路受损在年龄相关认知损害的发病机制中有重要作用^[19]。胰岛素通过与细胞膜表面的胰岛素受体蛋白(IR)相结合,激活下游的磷酸肌醇-3 激酶(PI-3K)、蛋白激酶 B(Akt 又称 PKB)、糖原合成激酶 3β(GSK3β)途径来发挥胰岛素介导的代谢效应。本研究发现,老年小鼠 IH 组胰岛素信号通路蛋白 Akt、GSK3β 蛋白表达水平显著降低,学习记忆时间长,认知功能损害明显;复氧治疗后老年 IH 小鼠 Akt、GSK3β 蛋白表达水平仍低于青年 IH 小鼠复氧组,学习记忆时间长,认知功能改善程度弱。近期亦有研究表明,高脂饮食与高血糖可以诱导海马内质网应激反应,从而损害胰岛素信号通路和认知功能^[20]。本研究也发现 Akt、GSK3β 的磷酸化蛋白表达水平与认知功能的行为学测试指标存在线性关系(比如小鼠在目标象限 LD 中的滞留时间)。由此本研究推测,胰岛素介导的信号通路可能在年龄相关的认知损害的发生、发展过程中有着重要作用,可能有增加老年调节间断性缺氧相关认知损害易感性的作用。

因此,老年小鼠在慢性间断性缺氧的条件下海马 CA1 区神经元凋亡增加和突触可塑性受损,伴有胰岛素信号通路蛋白 p-Akt、p-GSK3β 蛋白表达水平显著降低。上述结果表明,老年可能增加慢性间断性缺氧诱导认知损害的易感性,胰岛素介导的信号转导通可能参与易感性的调节过程。

参 考 文 献

- [1] Lal C, Strange C, Bachman D. Neurocognitive impairment in obstructive sleep apnea[J]. Chest, 2012, 141(6): 1601-1610.
- [2] Kawada T, Katsumata M, Inagaki H, et al. Sleep-disordered breathing and disorders of glucose metabolism[J]. Diabetes Metab Syndr, 2016, PMID: 27612395, DOI: 10. 1016/j. dsx. 2016. 09. 001
- [3] Ng SS, Chan TO, To KW, et al. Prevalence of obstructive sleep apnea syndrome and CPAP adherence in the elderly Chinese population[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0119829.
- [4] Netzer NC, Ancoli-Israel S, Bliwise DL, et al. Principles of practice parameters for the treatment of sleep disordered breathing in the elderly and frail elderly: the consensus of the International Geriatric Sleep Medicine Task Force[J]. Eur Respir J, 2016, 48(4): 992-1018.
- [5] Mattson MP. Energy intake and exercise as determinants of brain health and vulnerability to injury and disease[J]. Cell Metab, 2012, 16(6): 706-722.
- [6] Rönnekaa E, Zethelius B, Sundel f J, et al. Glucose metabolism

- and the risk of Alzheimer's disease and dementia: a population-based 12 year follow-up study in 71-year-old men[J]. *Diabetologia*, 2009, 52(8): 1504-1510.
- [7] Fagan KA. Selected contribution: pulmonary hypertension in mice following intermittent hypoxia [J]. *J Appl Physiol* (1985), 2001, 90(6): 2502-2507.
- [8] 王璋, 司良毅, 廖友斌. 大鼠睡眠呼吸暂停综合征动物模型的建立[J]. *中国实验动物学报*, 2006, 14(1): 40-43, 插 5.
- [9] Bromley-Brits K, Deng Y, Song W. Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice [J]. *J Vis Exp*, 2011 (53). PMID: 21808223, DOI: 10. 3791/2920
- [10] Guidotti Breting LM, Tuminello ER, Duke Han S. Functional neuroimaging studies in normal aging [J]. *Curr Top Behav Neurosci*, 2012, 10: 91-111.
- [11] Vernooij MW, Smits M. Structural neuroimaging in aging and alzheimer's disease[J]. *Neuroimaging Clin N Am*, 2012, 22(1): 33.
- [12] Smith GS. Aging and neuroplasticity[J]. *Dialogues Clin Neurosci*, 2013, 15(1): 3-5.
- [13] Decarli C, Kawas C, Morrison JH, et al. Session II: mechanisms of age-related cognitive change and targets for intervention: neural circuits, networks, and plasticity[J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2012, 67(7): 747-753.
- [14] Zimmerman ME, Aloia MS. Sleep-disordered breathing and cognition in older adults[J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2012, 12(5): 537-546.
- [15] Cherniack EP, Cherniack NS. Obstructive sleep apnea, metabolic syndrome, and age: will geriatricians be caught asleep on the job? [J]. *Aging Clin Exp Res*, 2010, 22(1): 1-7.
- [16] Zhang C, Li Y, Wang YL. Effect of intermittent hypoxia of sleep apnea on embryonic rat cortical neurons in vitro [J]. *Lin chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*, 2015, 29(9): 845-848.
- [17] Yin X, Zhang X, Lv C, et al. Protocatechuic acid ameliorates neurocognitive functions impairment induced by chronic intermittent hypoxia[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 14507.
- [18] Goldbart AD, Row BW, Kheirandish-Gozal L, et al. High fat/ refined carbohydrate diet enhances the susceptibility to spatial learning deficits in rats exposed to intermittent hypoxia[J]. *Brain Res*, 2006, 1090(1): 190-196.
- [19] Steen E, Terry BM, Rivera EJ, et al. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease-is this type 3 diabetes? [J]. *Journal of Alzheimers Disease*, 2005, 7(1): 63-80.
- [20] Cai M, Wang H, Li JJ, et al. The signaling mechanisms of hippocampal endoplasmic reticulum stress affecting neuronal plasticity-related protein levels in high fat diet-induced obese rats and the regulation of aerobic exercise[J]. *Brain Behav Immun*, 2016, 57: 347-359.

(2016-08-16 收稿)