

胰高血糖素样肽 1 (GLP-1) 改善阿尔茨海默病大鼠模型的认知功能及其机制研究

卢冲 李新宇 孙宇 刘丽 魏亚芬

【摘要】 目的 探讨胰高血糖素样肽 1 (GLP-1) 改善阿尔茨海默病大鼠认知功能的机制。**方法** 以正常成年雄性 SD 大鼠为研究对象, 将其随机分为正常对照组、AD 模型组、AD 模型 + GLP-1 干预组和 AD 模型 + PPAR γ 抑制剂 + GLP-1 干预组; 其中 AD 模型组以侧脑室注射 STZ (3 mg/kg, 10 μ L) 制造 AD 模型, AD 模型 + GLP-1 干预组在 AD 造模基础上每日腹腔注射利拉鲁肽 (200 μ g/kg, 10 μ L), 连续给药 28 d, AD 模型 + PPAR γ 抑制剂 + GLP-1 干预组在 AD 造模基础上侧脑室注射 PPAR γ 抑制剂 GW9662 (2.5 nmol/g, 10 μ L), 随后腹腔注射利拉鲁肽 (200 μ g/kg, 10 μ L) 并连续给药 28 d; 观察 4 组大鼠在 Morris 水迷宫中的学习和记忆能力变化; ELISA 方法观察各组大鼠海马 A β 42 的水平; Western blot 观察各组大鼠海马 PPAR γ 蛋白表达水平。**结果** 与 AD 模型组比较, GLP-1 干预后的 AD 大鼠在 Morris 水迷宫中学习和记忆能力明显改善, 海马 A β 42 的水平显著降低, 海马 PPAR γ 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$); 与 AD 模型 + GLP-1 干预组比较, AD 模型 + PPAR γ 抑制剂 + GLP-1 干预组大鼠海马 PPAR γ 蛋白表达水平显著降低, 在 Morris 水迷宫中学习和记忆能力明显下降, 海马 A β 42 的水平显著增高 ($P < 0.05$)。**结论** GLP-1 可能通过激活 PPAR γ 抑制 A β 蓄积, 从而起到改善阿尔茨海默病的认知功能作用。

【关键词】 阿尔茨海默病 胰高血糖素样肽 1 PPAR γ 淀粉样 β 蛋白

【中图分类号】 R742 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2019)02-0193-05

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2019.02.015

The effect and mechanism of Glucagon like peptide 1 (GLP-1) in improving cognitive function of Alzheimer's disease rat model Lu Chong*, Li Xinyu, Sun Yu, et al. * Department of Neurology, Heilongjiang Provincial Hospital, Harbin 150036

【Abstract】 Objective To explore the mechanism of glucagon like peptide 1 (GLP-1) in improving cognitive function of Alzheimer's disease rat model. **Methods** The health adult male SD rats were randomly divided into four groups, which were normal control group, AD model group, AD model + GLP-1 group, and AD model + PPAR γ inhibitor + GLP-1 group. The AD model rats were made by injection of STZ (3 mg/kg, 10 μ L) in the lateral ventricle. The rats of AD model + GLP-1 group were made by intraperitoneal injected Liraglutide (200 μ g/kg, 10 μ L) on the basis of AD model for 28 days. The rats of AD model + PPAR γ inhibitor + GLP-1 group were made by injected PPAR γ inhibitor GW9662 (2.5 nmol/g, 10 μ L) into the lateral ventricle on the basis of AD model and then intraperitoneal injected Liraglutide (200 μ g/kg, 10 μ L) for 28 days. The learning and memory ability of each group in the Morris water maze were observed. The level of A β 42 in the hippocampus of each group was observed by ELISA. And the PPAR γ protein expression level in the hippocampus of each group was observed by Western blot. **Results** Compared with the AD model group, the learning and memory ability of AD rats was significantly improved, and the level of A β 42 in the hippocampus decreased significantly, and the expression level of PPAR γ protein in the hippocampus was significantly increased in AD model + GLP-1 group. Compared with the AD model + GLP-1 group, the expression level of PPAR γ protein in the hippocampus was significantly decreased, and the learning and memory ability decreased significantly, and the level of A β 42 in the hippocampus increased significantly in the AD model + PPAR γ inhibitor + GLP-1 group. **Conclusion** GLP-1

基金项目: 黑龙江省青年科学基金资助项目 (QC2015123); 黑龙江省自然科学基金 (重点项目) (ZD2015018); 哈尔滨医科大学创新科学研究资助项目 (2016LCZX46)

作者单位: 150036 哈尔滨, 黑龙江省医院神经内科 [卢冲 刘丽 魏亚芬 (通信作者)], 普外科 (孙宇); 哈尔滨医科大学附属第一医院内分泌科 [李新宇 (并列第一作者)]

might inhibit the accumulation of A β by activating PPAR γ , and improve the cognitive function of Alzheimer's disease.

【Key words】 Alzheimer's disease Glucagon like peptide 1 PPAR γ Amyloid beta

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种以进行性认知障碍和记忆损害为主的中枢神经系统退行性病变,是引起老年性痴呆最常见的原因之一。随着世界人口年龄结构快速趋向老龄化,AD的发病率日趋上升,已成为老年人的第4位死因^[1]。AD的主要病理学特征是脑内出现由 β -淀粉样蛋白(β -amyloid protein, A β)聚集形成的高密度老年斑(senile plaques, SPs)和细胞内过度磷酸化 Tau 蛋白形成的神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFTs)^[2-3],而 A β 在脑内聚集所产生的神经毒性是AD发病机制中最核心的因素。因此,减少 A β 的生成,加速 A β 的降解是治疗 AD的关键环节^[4-5]。然而,迄今为止针对 A β 的 AD 治疗尤其是有效拮抗 A β 神经毒性作用的药物研究仍然没有突破性进展。2型糖尿病(Type 2 diabetes, T2DM)是最常见的代谢性疾病之一,也是与年龄密切相关的一类疾病^[6]。大量研究均证实 T2DM 与 AD 的发生发展有密切关系,两者在发病过程中均伴有淀粉样物质的出现、tau 蛋白的过度磷酸化、胰岛素信号的异常、海马长时程增强效应的降低等^[7-8],因而 AD 也被称为“第3类型的糖尿病”^[9]。

由于 AD 和 T2DM 具有相当类似的病理特征和发病分子机制,将治疗 T2DM 的药物用于 AD 的预防和治疗已经激起人们的广泛兴趣。作为目前 T2DM 最重要和最希望的治疗性药物,胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide-1, GLP-1)及其类似物已经应用于2型糖尿病的治疗,并表现出了除降低血糖外的其他一系列生理功能。有研究证据显示 GLP-1 及其类似物可透过血脑屏障,通过降低内源性 A β 水平及神经元 APP 水平、减少脑内的氧化应激和免疫应答来实现对中枢神经系统的保护作用^[10-12],但其神经保护作用的具体机制目前尚不明确。过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR γ)属于 II 型核受体超家族成员,为配体激活转录因子。PPAR γ 在体内参与脂、糖、能量代谢,炎症反应及免疫调节等^[13]。已有研究证实,大脑慢性炎症与 AD 的发病相关,其炎症细胞因子、趋化因子和胶质细胞标志物水平皆升高,并可加速 AD 患者大脑中 A β

的产生与沉积,PPAR γ 的激活与表达可抑制 A β 生成^[14-15]。因此,PPAR γ 成为 AD 治疗中一令人关注的作用靶点。Onuma 等^[16]研究发现,GLP-1 受体激动剂可增强内皮细胞中 PPAR γ 内在的活性。因此,根据以上研究成果,本研究提出 GLP-1 可能通过激活 PPAR γ 减少神经细胞内 β 样淀粉蛋白的产生,起到改善认知障碍的作用。这一假设的证实将揭示 GLP-1 神经元保护作用的具体机制,为治疗阿尔茨海默病提供新的理论依据,揭示新的作用靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

选取健康雄性 SD 大鼠 60 只,8~9 月龄,体重(220 \pm 20)g,将其随机分成 4 组,即正常对照组,AD 模型组,AD 模型 + GLP-1 干预组,AD 模型 + PPAR γ 抑制剂 + GLP-1 干预组。所用主要试剂:STZ(Sigma-Aldrich 公司,产品编号 S0130),利拉鲁肽(GLP-1 类似物,诺和诺德(中国)制药有限公司),PPAR γ 抑制剂 GW9662(R&D 公司,产品编号 1508/50),兔抗大鼠 A β 42 抗体(CellSignaling Technology 公司,产品编号 14974),小鼠抗大鼠 PPAR γ 抗体(Santa Cruz Biotechnolog 公司,产品编号 sc-390740),HRP 标记兔抗小鼠二抗(北京金杉中桥公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 ①正常对照组:健康雄性 SD 大鼠;②AD 模型组:健康雄性 SD 大鼠双侧侧脑室各注射 STZ(3 mg/kg 体重,10 μ L),第 3 d 重复注射 1 次;③AD 模型 + GLP-1 干预组:在 AD 模型建成后每日腹腔注射利拉鲁肽(200 μ g/kg 体重,10 μ L),连续给药 28 d;④AD 模型 + PPAR γ 抑制剂 + GLP-1 干预组:在 AD 模型建成后侧脑室注射 PPAR γ 抑制剂 GW9662(2.5 nmol/g 体重,10 μ L),30 min 后再腹腔注射利拉鲁肽(200 μ g/kg 体重,10 μ L),利拉鲁肽连续给药 28 d。

1.2.2 Morris 水迷宫实验 (1)定位航行实验:用于测量大鼠对水迷宫学习和记忆的能力。实验历时 5 d,每天分上、下午 2 个时段,共 9 个时段,每时段训练 4 次。训练时随机选择 1 个象限开始,按逆时

针方向将大鼠从各象限边缘中点位置面向池壁放入水中,观察并记录在 60 s 内找到平台的时间(逃避潜伏期);如果大鼠在 60 s 内未能找到平台,则人为引导至平台停留 10 s 后移开,潜伏期记为 60 s;隐匿平台逃避潜伏期反映大鼠空间记忆的获得情况,即空间学习记忆能力;(2)空间探索实验:用于测大鼠学会寻找平台后对平台空间位置记忆的能力。即在第 5 d 的第 5 次训练时撤除平台,然后任选 1 个入水点将大鼠面向池壁放入水中,由摄像系统及电脑路径软件自动记录大鼠 60 s 内穿越目标平台(原平台位置)次数。

1.2.3 酶联免疫吸附测定(ELISA) 样本的制备:将各组大鼠大脑皮层颞叶和海马组织匀浆, - 80 ℃ 冻存待测;测定时冰浴中融化,置 15 mL 离心管中 4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min,取上清液 50 μ L,按 ELISA 试剂盒说明书方法测定脑组织中 A β 42 水平,单位以皮克/毫升(pg/mL)蛋白水平计算。

1.2.4 蛋白免疫印迹(Western blot) 将各组大鼠迅速断头、取脑,分离海马组织,将其置于冰上 1.5 mL EPP 管中,按 100 mg/mL 加入 RIPA 裂解液,用匀浆仪匀浆(5 s \times 7 次),冰上静置 30 min;4 ℃、12 000 r/min 离心 30 min,取上清液混匀,根据测得的蛋白质水平,计算出各样品的上样量;常规电泳转膜后用 5% 脱脂牛奶封闭,加一抗 4 ℃ 孵育过夜;洗膜后用 HRP 标记的二抗室温下孵育 2 h;ECL 发光液孵育、胶片曝光、显影、定影;扫描仪扫描 X 光片;用 BIO RAD Quantity One 4.5.0 软件检测目的蛋白 PPAR γ 的条带及内参 GAPDH 的灰度值,目的蛋白灰度值和内参灰度值的比值作为目的蛋白 PPAR γ 表达的相对水平。

1.2.5 统计学处理 采用 SPSS 12.0 软件,实验数据用均数 \pm 标准误(means \pm SEM)表示,组间比较采用两样本的 *t* 检验,组内比较采用单因素方差分析(ANOVA)。以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组大鼠行为学观察

2.1.1 定位航行实验

如图 1 所示,随着训练次数的增加,各组大鼠寻找平台的潜伏期均呈现明显缩短趋势,训练第 5 个时段以后潜伏期逐渐趋于平稳,即各组大鼠均获得一定学习记忆的能力,但 AD 模型组大鼠与正常对

照组大鼠比较,于训练第 3 个时段开始寻找平台潜伏期明显延长($P < 0.05$);AD 模型 + GLP-1 干预组与 AD 模型组比较,其寻找平台潜伏期明显缩短($P < 0.05$),而与 AD 模型 + GLP-1 干预组比较,AD 模型 + PPAR γ 抑制剂 + GLP-1 干预组大鼠寻找平台潜伏期明显延长($P < 0.05$)。

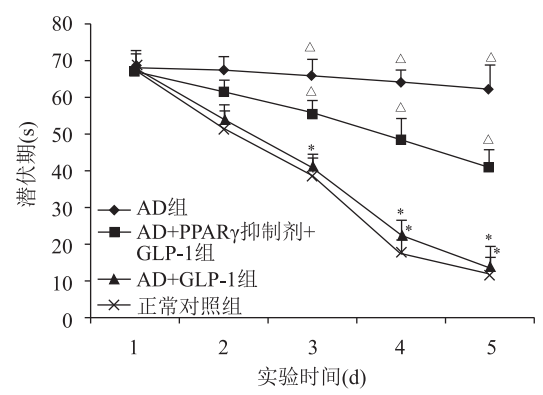


图 1 定位航行试验中各组大鼠逃避潜伏期的比较 与 AD 组比较, * $P < 0.05$;与 AD + GLP-1 组比较, $\Delta P < 0.05$

2.1.2 空间探索实验

如图 2 所示,实验大鼠在 60 s 的空间探索实验中 AD 模型组大鼠与正常对照组大鼠比较,其穿越平台次数明显减少($P < 0.05$),而 AD 模型 + GLP-1 干预组大鼠穿越目标平台次数较 AD 模型组显著增加($P < 0.05$)。AD 模型 + PPAR γ 抑制剂 + GLP-1 干预组大鼠穿越目标平台次数与 AD 模型 + GLP-1 干预组大鼠比较明显减少($P < 0.05$)。

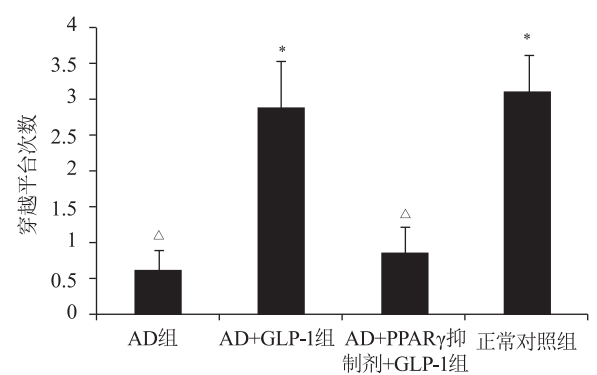


图 2 空间探索试验中各组大鼠穿越平台次数比较 与 AD 组比较, * $P < 0.05$;与 AD + GLP-1 组比较, $\Delta P < 0.05$

2.2 各组大鼠海马 A β 42 的水平比较

如图 3 所示,ELISA 定量检测表明,与正常对照组比较,AD 模型组大鼠海马 A β 42 的水平显著增高($P < 0.05$)。AD 模型 + GLP-1 干预组大鼠与 AD 模型大鼠比较,海马 A β 42 水平显著 ($P <$

0.05)。AD 模型 + PPAR γ 抑制剂 + GLP-1 干预组大鼠与 AD 模型 + GLP-1 干预组大鼠比较,其海马 A β 42 水平显著增高($P<0.05$)。

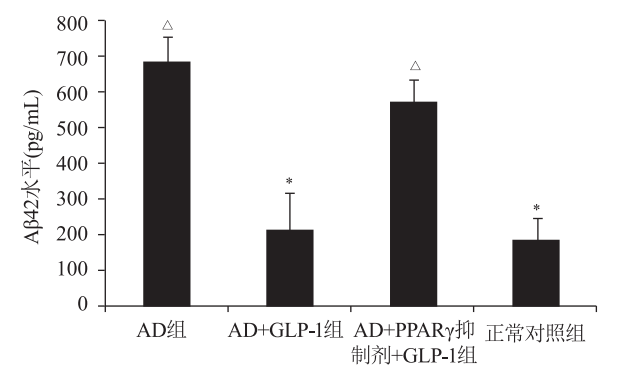


图3 各组大鼠海马中 A β 42 水平比较 与 AD 组比较,* $P<0.05$;与 AD + GLP-1 组比较, Δ $P<0.05$

2.3 各组大鼠海马 PPAR γ 蛋白表达水平比较

Western Blot 显示(图 4),与正常对照组比较,AD 模型组大鼠海马 PPAR γ 的表达水平显著降低($P<0.05$)。与 AD 模型组比较,AD 模型 + GLP-1 干预组大鼠海马 PPAR γ 的表达水平显著升高($P<0.05$)。AD 模型 + PPAR γ 抑制剂 + GLP-1 干预组大鼠海马 PPAR γ 的表达水平较其他 3 组大鼠均显著降低($P<0.05$)。

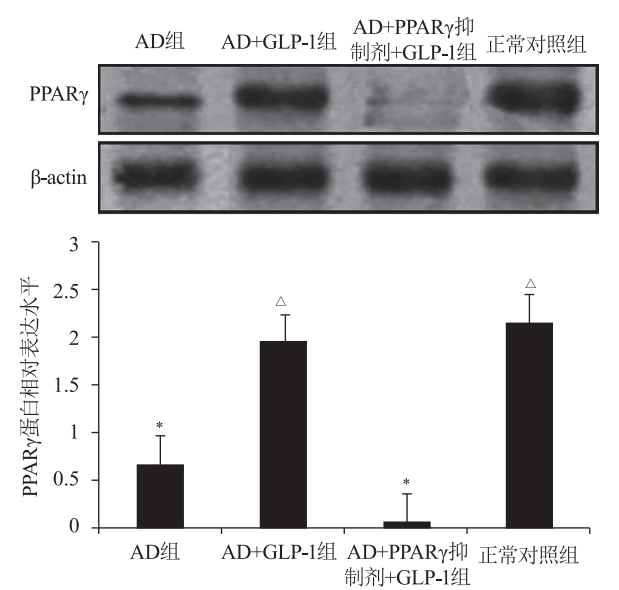


图4 各组大鼠海马 PPAR γ 蛋白表达水平比较 与正常对照组比较,* $P<0.05$;与 AD + GLP-1 组比较, Δ $P<0.05$

3 讨论

阿尔茨海默病(Alzheimer'S disease, AD)和 2

型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)均为与年龄相关的退行性变疾病,除具有相似的流行病学及生物化学特征外,还具有许多类似的病理特征和生理功能改变^[7-8],例如两者在发病过程中均伴有淀粉样物质的出现、tau 蛋白的过度磷酸化、胰岛素信号的异常、海马长时程增强效应的降低等。由于 AD 和 T2DM 具有相当类似的病理特征和发病分子机制,阿尔茨海默病也被称为“第 3 类型糖尿病”^[9]。因此,将治疗 T2DM 的药物用于 AD 的预防和治疗越来越被重视。有研究对老年女性 T2DM 患者进行了 2 年的随访,发现未采取治疗措施的 T2DM 患者认知功能和行为能力与正常老年组比较明显下降,而给予口服降糖药物治疗的 T2DM 患者其认知功能与正常对照组基本一致^[17],可见将糖尿病治疗药物应用于阿尔茨海默病防治切实可行。

作为目前 T2DM 最重要和最希望的治疗性药物,胰高血糖素样肽-1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1)及其类似物已经在治疗 2 型糖尿病之外表现出了其他一系列生理功能。比如在阿尔茨海默病、帕金森病等神经退行性疾病的前期临床试验中已证实 GLP-1 类似物可透过血脑屏障发挥显著的神经保护作用^[10]。尽管 GLP-1 的中枢作用及其机制尚有许多问题等待解答,但 GLP-1 容易通过血脑屏障、脑内存在 GLP-1R 以及 GLP-1 改善 AD 转基因动物认知功能已成为不争的事实。在阿尔茨海默病和帕金森病的动物模型中 GLP-1 类似物已经表现出通过降低内源性 A β 水平来实现对中枢神经系统的保护作用^[10-12]。本研究对 STZ 造模的 AD 大鼠模型应用 GLP-1 干预,发现与未干预的 AD 大鼠比较,应用了 GLP-1 的 AD 大鼠学习和记忆能力都得到了明显改善,且应用 GLP-1 的 AD 大鼠海马 A β 水平较未应用 GLP-1 的 AD 大鼠显著降低,这也从动物模型水平再次证实了 GLP-1 对改善认知功能方面的作用,且这种作用可能与 A β 减少有关。也说明 GLP-1 对阿尔茨海默病具有治疗作用,这一结论与以往研究相一致,但其具体治疗机制尚不明确。

PPAR γ 属于 II 型核受体超家族成员,与其他甾体激素受体一样,也是配体激活转录因子。PPAR γ 生理功能广泛,在体内参与脂、糖、能量代谢,炎症反应及免疫调节等^[13]。大量试验证实,大脑慢性炎症与 AD 的发病相关,其炎症细胞因子、趋化因子和胶质细胞标志物水平皆升高,并可加速

AD 患者大脑中 A β 的产生与沉积;当炎症因子促进 A β 生成的时候,PPAR γ 的激活与表达可抑制 A β 生成^[14-15]。而应用经典降糖药物格列美脲可通过激活 PPAR γ 有效减少脑组织中 A β 的产生^[18]。因此,通过激活 PPAR γ 来减少 A β 的生成,抑制 AD 的发生发展,成为 AD 治疗中又一令人关注的靶点。

GLP-1 作为多环节、多靶点治疗糖尿病的新一代药物,有研究发现 GLP-1 受体激动剂 Exendin-4 处理的 HUVEC 细胞内 PPAR γ 转录活性明显升高,表明 GLP-1 受体激动剂可增强内皮细胞中 PPAR γ 的活性^[16]。因此,本研究提出 GLP-1 可能通过激活 PPAR γ 来减少神经细胞内 A β 的生成,起到改善认知障碍的作用。为证实这一假设,本研究对 AD 大鼠进行 PPAR γ 抑制剂的侧脑室注射,抑制脑组织中 PPAR γ 活性,随后对其再行 GLP-1 干预,发现与 AD 模型 + GLP-1 干预大鼠比较,PPAR γ 抑制剂 + GLP-1 干预组大鼠在行 Morris 水迷宫实验时其寻找平台潜伏期明显延长、穿越目标平台次数明显减少、认知功能明显下降,且海马 A β 水平显著增高。可见虽然给予 GLP-1 干预,但在抑制了 PPAR γ 活性后 GLP-1 改善认知功能的作用明显降低。由此可推断 GLP-1 可能通过激活 PPAR γ 来减少神经细胞内 A β 的生成,起到改善认知障碍的作用。

综上所述,针对阿尔茨海默症与 2 型糖尿病相似的错综复杂的发病机制等问题,本研究提出了应用治疗糖尿病的新兴药物 GLP-1 治疗阿尔茨海默症,并寻找其改善认知障碍的机制,即 GLP-1 可能通过激活 PPAR γ 来减少神经细胞内 A β 的生成,起到改善认知障碍的作用,以此可发现新的治疗阿尔茨海默症的关键靶点,并为阿尔茨海默症的治疗提供新的实验室依据。

参 考 文 献

- [1] Alzheimer's Association. Alzheimer's disease facts and figures [J]. *Alzheimers Dement*, 2012, 8(2): 131-168.
- [2] Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics [J]. *Science (New York, N. Y.)*, 2002, 297(5580): 353-356.
- [3] Goedert M. Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease [J]. *Trends in Neurosciences*, 1993, 16(11): 460-465.
- [4] Bloom GS. Amyloid-beta and Tau The Trigger and Bullet in Alzheimer Disease Pathogenesis [J]. *JAMA Neurology*, 2014, 71(4): 505-508.
- [5] Li Chao-yun, Zug C, Qu Hong-chun, et al. Hesperidin ameliorates behavioral impairments and neuropathology of transgenic APP/PS1 mice [J]. *Behavioural Brain Research*, 2015, 281: 32-42.
- [6] Fei M, Yan Ping-z, Ru Juan-m, et al. Riskfactors for dementia with type 2 diabetes mellitus among elderly People in China [J]. *Age and Ageing*, 2013, 42(3): 398-400.
- [7] Dar TA, Sheikh IA, Ganie SA, et al. Molecular linkages between diabetes and alzheimer's disease: current scenario and future prospects [J]. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets*, 2014, 13(2): 290-298.
- [8] Janson J, Laedtke T, Parisi JE, et al. Increased risk of type 2 diabetes in Alzheimer disease [J]. *Diabetes*, 2004, 53(2): 474-481.
- [9] Kroner Z. The relationship between Alzheimer's disease and diabetes; Type 3 diabetes? [J]. *Alternative Medicine Review*, 2009, 14(4): 373-379.
- [10] Duarte AI, Candeias E, Correia SC, et al. Crosstalk between diabetes and brain: glucagon-like peptide-1 mimetics as a promising therapy against neurodegeneration [J]. *Biochimica et Biophysica acta*, 2013, 1832(4): 527-541.
- [11] Ma Tao, Du Xu-liang, Pick JE, et al. Glucagon-Like peptide-1 cleavage product GLP-1(9-36) amide rescues synaptic plasticity and memory deficits in alzheimer's disease model mice [J]. *Journal of Neuroscience*, 2012, 32(40): 13701-13708.
- [12] McClean PL, Hölscher C. Liraglutide can reverse memory impairment, synaptic loss and reduce plaque load in aged APP/PS1 mice, a model of Alzheimer's disease [J]. *Neuropharmacology*, 2014, 76(Pt A): 57-67.
- [13] Monsalve Fa, Pyarasani Rd, Delgado-Lopez F, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor targets for the treatment of metabolic diseases [J]. *Mediators of Inflammation*, 2013, 2013: 549627.
- [14] Sakurai T. Targets of the peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist trials for the prevention of Alzheimer disease [J]. *Archives of Neurology*, 2011, 68(4): 542-543.
- [15] Heneka MT, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, et al. Acute treatment with the PPAR γ agonist pioglitazone and ibuprofen reduces glial inflammation and Abeta1-42 levels in APPV717I transgenic mice [J]. *Brain*, 2005, 128(Pt 6): 1442-1453.
- [16] Onuma H, Inukai K, Kitahara A, et al. The glucagon-like peptide 1 receptor agonist enhances intrinsic peroxisome proliferator-activated receptor γ activity in endothelial cells [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014, 451(2): 339-344.
- [17] Logroscino G, Kang J H, Grodstein F. Prospective study of type 2 diabetes and cognitive decline in women aged 70-81 years [J]. *BMJ (Clinical Research ed.)*, 2004, 328(7439): 548.
- [18] Liu F, Wang Y, Yan M, et al. Glimepiride attenuates A β production via suppressing BACE1 activity in cortical neurons [J]. *NeurosciLett*, 2013, 557(Pt B): 90-94.

(2018-07-17 收稿)