

罗格列酮对去卵巢大鼠学习记忆及 脑内 TNF- α 、IL-6 表达的影响

郑志民¹,周寿红²,胡弼²

(1. 永州职业技术学院药理学教研室,湖南 永州 425006;2. 南华大学医学院生理学教研室)

摘要: **目的** 观察罗格列酮对去卵巢大鼠学习记忆功能及海马内肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白介素-6 (IL-6)表达的影响。**方法** 56 只 SD 雌性大鼠,随机分为 4 组:假手术对照组、去卵巢组、假手术 + 罗格列酮组、去卵巢 + 罗格列酮治疗组,第 15 周进行 Morris 水迷宫试验。第 16 周处死大鼠,ELISA 法检测大鼠脑海马区的 TNF- α 、IL-6 的表达。**结果** 与假手术组比较,去卵巢组大鼠学习记忆能力明显下降 ($P < 0.01$),大脑海马区 TNF- α 和 IL-6 的表达明显升高 (均 $P < 0.01$);与去卵巢组比较,罗格列酮治疗组大鼠学习记忆能力明显改善,大脑海马区 TNF- α 和 IL-6 的表达明显降低 (均 $P < 0.01$)。**结论** 罗格列酮能改善去卵巢大鼠的学习记忆障碍,其机制可能与其降低海马 TNF- α 和 IL-6 的表达有关。

关键词: 罗格列酮; 去卵巢; 学习记忆; TNF- α ; IL-6

中图分类号:R963

文献标识码:A

Effects of Rosiglitazone on the Learning and Memory and Expression of Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-6 in the Hippocampus in Ovariectomized Rats

ZHENG Zhimin¹, ZHOU Shouhong², HU Bi²

(Department of Pharmacology, Vocational Institute of Technology of Yongzhou,
Yongzhou Hunan 425006, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of rosiglitazone on the learning and memory and expression of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in the cerebrum in ovariectomized rats. **Methods** Fifty-six male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 4 groups: the sham control group (SC), ovariectomized group (OV), sham control + rosiglitazone group (SC + R) and ovariectomized + rosiglitazone group, (OV + R). The Morris water maze test was performed at the fifteenth week. The rats were sacrificed at the sixteenth week. The expressions of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in the hippocampus were measured by ELISA assay. **Results** Compared with the SC group, the ability of learning and memory were significantly decreased and the expressions of TNF- α and IL-6 in the hippocampus were significantly increased in the OV group (all $P < 0.01$). Compared the OV group, the ability of memory was significantly increased and the expressions of TNF-6 and IL-6 in the hippocampus were significantly decreased in the OV + R group (all $P < 0.01$). **Conclusion** Rosiglitazone improves the impairment of learning and memory in ovariectomized rats, the mechanism of which may be associated with the down-regulation of TNF- α and IL-6 in the hippocampus induced by rosiglitazone.

Key words: Rosiglitazone; Ovariectomy; Learning and memory; TNF- α ; IL-6

女性绝经后阿尔茨海默病的发病率明显上升, 普遍认为主要与女性绝经后雌激素水平显著降低有

关^[1]。使用雌激素替代疗法导致女性部分生殖系统肿瘤发病率呈上升趋势^[2],故临床使用尚有争议。罗格列酮是过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferators activated receptor- γ , PPAR- γ) 人工合成的激动药。近几年研究发现,罗格列酮能改善多种原因引起的动物学习记忆障碍^[3-4],罗格列酮能提高阿尔茨海默病患者的学习记忆能力^[5-6]。而罗格列酮对于去卵巢大鼠学习记忆障碍模型影响的研究还未见报道,故本实验采用双侧卵巢摘除术 (ovariectomy, OVX) 制备去卵巢大鼠模型,研究罗格列酮对去卵巢大鼠学习记忆能力及脑内 TNF- α 和 IL-6 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

罗格列酮购于浙江万马药业有限公司;TNF- α 和 IL-6 ELISA 试剂盒购于 RD 公司。Morris 水迷宫装置由南华大学医学院生理学教研室提供;Hema TGL-18R 型冷冻离心机 (珠海黑马医学仪器有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组 健康清洁级雌性 SD 大鼠 56 只,体重 230 ~ 280 g,由中南大学湘雅医学院动物部提供;大鼠常规饲养 4 天后,随机将 56 只 SD 大鼠分为假手术对照组 (sham control group, SC 组)、去卵巢组 (ovariectomized group, OV 组)、假手术 + 罗格列酮组 (sham control + rosiglitazone group, SC + R 组)、去卵巢 + 罗格列酮组 (ovariectomized + rosiglitazone group, OV + R 组),每组 14 只。均以普通饲料喂养,自由饮水。

1.2.2 动物模型制备 各组经戊巴比妥钠腹腔麻醉后,仰面固定,腹正中切口,沿子宫双角找到双侧卵巢并充分暴露,OV 及 OV + R 组大鼠切除双侧卵巢,SC 及 SC + R 组则不切除卵巢,分层缝合。

1.2.3 治疗方法 术后一周,刀口愈合,饮食正常,无肢体残疾,开始灌胃给药。共进行 13 周,OV + R 组给予罗格列酮 (5 mg/kg/d)^[7],OV 及 SC 组给予等体积生理盐水。

1.2.4 Morris 水迷宫实验 术后 15 周进行 Morris 水迷宫实验。水迷宫直径 80 cm,高 40 cm,分为 4 个象限,第三象限放置一圆柱形透明玻璃站台,高 25.5 cm,直径 12 cm。站台置于水下 0.5 cm,水温

(25 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$,实验期间保持环境安静。采用 Morris 水迷宫图像自动监视处理系统完成数据的采集和处理。

1.2.5 定位航行实验 实验进行 4 天,每天进行 4 次,每次采用不同象限入水,每次训练 70 s。大鼠如在 70 s 内找到平台并停留 3 s,则训练结束,记录其找到平台的时间为潜伏期;如 70 s 内未找到平台,则将大鼠牵引到平台停留 10 s,记录潜伏期为 70 s;计算大鼠每日由第三象限下水找到平台的平均潜伏期。

1.2.6 空间探索实验 实验第 5 天,撤去平台,选择第三象限作为下水点,记录大鼠 60 s 内穿越平台区域次数为穿越目标次数;记录大鼠 60 s 内穿越平台区域时间为穿越目标时间。

1.2.7 大鼠海马组织中 TNF- α 和 IL-6 水平检测 Morris 水迷宫实验后,各组大鼠休息 2 天。术后 16 周断头处死大鼠,冰上迅速剖脑,分出海马,称重后加入预先冰冻的少量酸化正丁醇的玻璃匀浆器中,研磨制成匀浆,3500 r/min 离心 15 min,取上清,用 ELISA 酶联免疫法检测 TNF- α 和 IL-6 水平,操作按试剂盒说明进行。

1.2.8 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件分析,实验数据以 $\bar{x} \pm \text{SD}$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 罗格列酮对去卵巢大鼠学习记忆能力的影响

应用 Morris 水迷宫实验对各组大鼠学习记忆能力进行比较。结果如表 1 所示:各组大鼠随着训练天数增加,寻找平台的潜伏期明显缩短;与 SC 组比较,OV 组大鼠寻找平台的潜伏期明显延长 ($P < 0.01$),穿越目标次数明显减少 ($P < 0.01$),穿越目标时间明显缩短 ($P < 0.01$);与 OV 组比较,OV + R 组大鼠寻找平台的潜伏期明显缩短 ($P < 0.01$),穿越目标次数明显增加 ($P < 0.01$),穿越目标时间明显延长 ($P < 0.01$)。

2.2 罗格列酮对去卵巢大鼠海马组织中 TNF- α 和 IL-6 表达的影响

如表 2 所示,与 SC 组比较,OV 组大鼠海马组织 TNF- α 和 IL-6 表达明显升高 ($P < 0.01$);与 OV 组比较,OV + R 组大鼠海马组织 TNF- α 和 IL-6 表达明显降低 ($P < 0.01$)。

表1 罗格列酮对去卵巢大鼠学习记忆的影响 (n = 14)

组别	定位航行实验				空间探索实验	
	第一天(s)	第二天(s)	第三天(s)	第四天(s)	穿越目标次数	穿越目标时间(s)
SC	60.1 ± 2.5	50.6 ± 3.1	18.6 ± 5.2	7.5 ± 2.1	4.25 ± 1.6	10.3 ± 3.8
SC + R	60.4 ± 2.7	51.2 ± 2.8	18.9 ± 4.8	7.8 ± 2.3	4.18 ± 1.7	9.9 ± 3.6
OV	59.3 ± 3.4	55.4 ± 4.9a	28.3 ± 4.1 ^a	15.5 ± 3.1 ^a	2.12 ± 0.9 ^a	5.4 ± 2.4 ^a
OV + R	59.8 ± 4.7	51.3 ± 3.9b	20.2 ± 3.9 ^b	8.2 ± 2.4 ^b	4.12 ± 1.3 ^b	8.9 ± 2.8 ^b

与 SC 组比较, a, $P < 0.01$; 与 OV 组比较, b, $P < 0.01$

表2 各组大鼠海马组织 TNF-α、IL-6 表达 (n = 14)

组别	TNF-α	IL-6
SC	138.4 ± 14.5	62.7 ± 6.7
SC + R	135.2 ± 12.3	61.2 ± 6.1
OV	217.6 ± 17.2 ^a	98.3 ± 8.6 ^a
OV + R	175.8 ± 15.8 ^b	80.4 ± 8.9 ^b

与 Sc 组比较, a, $P < 0.01$; 与 Ov 组比较, b, $P < 0.01$

3 讨 论

去卵巢大鼠学习记忆障碍模型是经典的研究绝经后女性阿尔茨海默病的动物模型。本实验中我们采用双侧卵巢摘除术制备去卵巢大鼠学习记忆障碍模型,通过 Morris 水迷宫实验证明大鼠的学习记忆能力明显下降,说明本实验建模成功。

越来越多的临床和实验证明,阿尔茨海默病与慢性炎症存在重要联系。炎症因子参与了阿尔茨海默病神经炎症损伤的病理过程^[8]。阿尔茨海默病患者死后,尸体病理解剖发现脑内炎症因子表达明显升高^[9]。阿尔茨海默病患者血浆中 TNF-α 和 IL-6 水平明显高于健康对照者^[10-11]。体内 TNF-α 的高表达能加速阿尔茨海默病患者的认知损伤^[12]。

女性绝经后阿尔茨海默病等神经退行性疾病的发病率明显升高,普遍认为与卵巢萎缩导致体内雌激素水平明显下降有关。研究发现,去卵巢猕猴颈动脉 TNF-α、IL-6 等炎症因子表达明显升高,氧化应激明显增强,补充雌激素能降低去卵巢猕猴颈动脉 TNF-α 和 IL-6 等炎症因子表达和氧化应激^[13];老龄小鼠体内雌激素水平、活性明显下降,导致小鼠神经炎症明显增强^[14]。上述实验说明雌激素具有一定抗炎和抗氧化应激作用,而女性绝经后因为体内雌激素水平下降导致雌激素上述作用减弱,引起女性绝经后神经炎症及氧化应激增强,这可能是女性绝经后阿尔茨海默病等神经退行性疾病发病率明显上升的原因。本实验中我们用 ELISA 法检测去卵巢大鼠大脑海马区 TNF-α 和 IL-6 的表达,结果显示

与假手术组比较,去卵巢大鼠组海马区 TNF-α 和 IL-6 的表达显著升高 ($P < 0.01$),与以往研究相符。

罗格列酮是人工合成的 PPAR-γ 激动药,是经典的胰岛素增敏药,本实验室前期研究发现,罗格列酮能改善去卵巢大鼠的胰岛素抵抗^[15]。PPAR-γ 属于细胞核受体,是一种配体激活型转录调控因子。研究发现,PPAR-γ 对神经退行性疾病中细胞具有保护作用^[16]。激动 PPAR-γ 能抑制巨噬细胞 TNF-α 和 IL-6 的产生,抑制多种炎症因子的表达^[17]。罗格列酮能降低糖尿病大鼠血清中 TNF-α 和 IL-6、c-反应蛋白的表达^[18]。罗格列酮能改善脑局灶缺血小鼠的学习记忆能力^[19]。罗格列酮能降低大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后脑组织中炎症因子 TNF-α 和 IL-6 蛋白表达水平^[20]。本实验中,与 SC 组比较,OV 组大鼠学习记忆能力明显降低,脑部海马区 TNF-α 和 IL-6 蛋白表达明显升高;与 OV 组比较,OV + R 组大鼠学习记忆能力显著提高,脑部海马区 TNF-α 和 IL-6 蛋白表达显著降低,说明罗格列酮能改善去卵巢大鼠的学习记忆障碍,其机制可能与其降低去卵巢大鼠海马 TNF-α 和 IL-6 蛋白表达有关。

参考文献:

[1] 杨华,屈秋明,郭峰,等. 雌激素在阿尔茨海默病患者的改变及其意义[J]. 中国神经精神病杂志,2007,33(3):179-182.

[2] Alexander IM. The history of hormone therapy use and recent controversy related to heart disease and breast cancer arising from prevention trial outcomes[J]. J Midwifery Womens Health,2012,57(6):547-557.

[3] Rodriguez-Rivera J, Denner L, Dineley KT. Rosiglitazone reversal of Tg2576 cognitive deficits is independent of peripheral gluco-regulatory status[J]. Behav Brain Res, 2011,216(1):255-261.

[4] Escribano L, Simón AM, Pérez-Mediavilla A, et al. Rosiglitazone reverses memory decline and hippocampal glucocorticoid receptor down-regulation in an Alzheimer's disease mouse model[J]. Biochem Biophys Res Commun,

- 2009,379(2):406-410.
- [5] Risner ME, Saunders AM, Altman JF, et al. Efficacy of rosiglitazone in a genetically defined population with mild-to-moderate Alzheimer's disease [J]. *Pharmacogenomics J*, 2006, 6(4):246-254.
- [6] Watson GS, Cholerton BA, Reger MA, et al. Preserved cognition in patients with early Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment during treatment with rosiglitazone; a preliminary study [J]. *Am J Geriatr Psychiatry*, 2005, 13(11):950-958.
- [7] 文金生, 胡弼, 龙光, 等. 罗格列酮对果糖饲养大鼠血糖血脂及血管重构的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2004, 20(5):571-575.
- [8] Richardson C, Gard PR, Klugman A, et al. Blood pro-inflammatory cytokines in Alzheimer's disease in relation to the use of acetylcholinesterase inhibitors [J]. *Int J Geriatr Psychiatry*, 2013, 28(12):1312-1317.
- [9] Iwamoto N, Nishiyama E, Ohwada J, et al. Demonstration of CRP immunoreactivity in brains of Alzheimer's disease; immunohistochemical study using formic acid pretreatment of tissue sections [J]. *Neurosci Lett*, 1994, 177(1-2):23-26.
- [10] Helmy AA, Naseer MM, Shafie SE, et al. Role of interleukin 6 and alpha-globulins in differentiating Alzheimer and vascular dementias [J]. *Neurodegener Dis*, 2012, 9(2):81-86.
- [11] Darreh-Shori T, Vijayaraghavan S, Aeinehband S, et al. Functional variability in butyrylcholinesterase activity regulates intrathecal cytokine and astroglial biomarker profiles in patients with Alzheimer's disease [J]. *Neurobiol Aging*, 2013, 34(11):2465-2481.
- [12] Holmes C, Cunningham C, Zotova E, et al. Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease [J]. *Neurology*, 2009, 73(10):768-774.
- [13] Sophonsritsuk A, Appt SE, Clarkson TB, et al. Differential effects of estradiol on carotid artery inflammation when administered early versus late after surgical menopause [J]. *Menopause*, 2013, 20(5):540-547.
- [14] Benedusi V, Meda C, Della Torre S, et al. A lack of ovarian function increases neuroinflammation in aged mice [J]. *Endocrinology*, 2012, 153(6):2777-2788.
- [15] 郑志民, 刘显庆, 周寿红, 等. 罗格列酮通过上调脂肪脂联素及其受体的表达改善去卵巢大鼠胰岛素抵抗 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009(5):383-386.
- [16] Deplanque D. Cell protection through PPAR nuclear receptor activation [J]. *Therapie*, 2004, 59(1):25-29.
- [17] Rigamonti E, Chinetti-Gbaguidi G, Staels B. Regulation of macrophage functions by PPAR-alpha, PPAR-gamma, and LXRs in mice and men [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(6):1050-1059.
- [18] 张晓菲, 赫飞, 杨景. 罗格列酮对糖尿病大鼠血清炎症介质和早期皮肤改变的影响 [J]. *第三军医大学学报*, 2010(10):1016-1019.
- [19] 尚进林, 孙莉, 梁浩, 等. 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 激动剂对小鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *中华神经科杂志*, 2009, 42(3):190-194.
- [20] 郭金涛, 高甜, 宋颖飞. PPAR γ 激动剂对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量的影响 [J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2008, 11(2):20-22.

(此文编辑:秦旭平)