

有氧运动联合螺旋藻营养补充对 2 型糖尿病大鼠学习记忆的影响及其机制

朱洪竹*, 朱梅菊

井冈山大学体育学院, 吉安 343009

摘要: 本文采用 2 型糖尿病大鼠模型, 应用 Tunel 荧光染色、Western blot 等方法研究有氧运动联合螺旋藻对 2 型糖尿病大鼠学习记忆功能和对 ERK/CREB 信号通路及 cleaved caspase-3 表达的影响。成模大鼠随机分为 4 组: 糖尿病模型组 (DM)、糖尿病 + 运动组 (DE)、糖尿病 + 螺旋藻组 (DS)、糖尿病 + 运动 + 螺旋藻组 (DES), 另设对照组 (C), 每组 10 只。实验末, 检测海马 p-ERK、p-CREB、ERK、CREB、cleaved caspase-3 蛋白表达, 观察海马细胞凋亡情况, 评估大鼠学习记忆能力, 同时测试血糖、血胰岛素等指标。结果显示: 与 DM 组相比, DE、DS、DES 组血糖和血胰岛素水平平均降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 逃避潜伏期明显缩短 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 穿越平台次数增多 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 海马细胞凋亡率及 cleaved caspase-3 表达均明显减少 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), p-ERK/ERK 与 p-CREB/CREB 水平均明显增加 ($P < 0.01$)。其中以 DES 组的改善效果最好。以上说明有氧运动和螺旋藻能降低血糖, 有效改善糖尿病大鼠学习记忆, 且运动联合螺旋藻方案有更明显的应用效果, 优于单纯的有氧运动和螺旋藻, 其机理可能与其进一步上调 ERK/CREB 信号途径, 减少 cleaved caspase-3 表达, 一定程度抑制细胞凋亡, 发挥海马神经元保护作用有关。

关键词: 糖尿病; 学习记忆; 有氧运动; 螺旋藻; ERK/CREB 信号通路; 细胞凋亡

中图分类号: R131

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)11-1845-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.11.005

The effects of aerobic exercise and spirulina supplement on learning and memory function in hippocampus of type 2 diabetes rats and its mechanism

ZHU Hong-zhu*, ZHU Mei-ju

School of PE & Sports Science, Jinggangshan University, Jian 343009, China

Abstract: Using the rat model of type 2 diabetes and the methods of Tunnel dyeing and Western blot, this study aimed to investigate effects of aerobic exercise plus spirulina supplement (SP) on learning and memory function, ERK/CREB signaling pathway and cleaved caspase-3 expression in hippocampus of type 2 diabetes rats. The model rats were randomly divided into diabetes model group (DM), diabetes exercise group (DE), diabetes SP group (DS) and diabetes exercise SP group (DES), additionally provided control group (C) without any intervention (10 rats each group). Learning and memory and the hippocampus cells apoptosis rates were observed. The expressions of p-ERK, p-CREB, ERK, CREB and cleaved caspase-3 were tested; at the same time, changes of blood glucose and serum insulin, and so on were examined in the end of the experiment. **Results:** Compared with group DM, blood glucose and serum insulin levels of the intervention groups decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), the escape latencies of the groups were shortened and the numbers plateau crossing increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The cells apoptosis rate and cleaved caspase-3 expression of the rats decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), the levels of P-ERK/ERK, P-CREB/CREB in the groups increased obviously ($P < 0.01$). The improvement of the above indicators was more obvious in group DES than that in group DE and DS. These results suggested that aerobic exercise and SP could reduce blood glucose and improve learning and memory of type 2 diabetes rats, and the neuro-protective effect of exercise combined with SP was better than those in exercise and SP alone. The mechanism is related to the

收稿日期: 2021-02-22 接受日期: 2021-09-29

基金项目: 国家自然科学基金 (31660291, 31360255); 江西省自然科学基金 (20202BABL206124); 江西省教育厅科技计划 (GJJ190562)

* 通信作者 Tel: 86-0796-8100491; E-mail: zhuhongzhu2007@163.com

up-regulation of ERK/CREB signaling pathway, and down-regulation of cleaved caspase-3 expression then further inhibit hippocampus cell apoptosis for type 2 diabetes rats.

Key words: diabetes mellitus; learning and memory; aerobic exercise; spirulina; ERK/CREB signaling pathway; cell apoptosis

2型糖尿病患者约有65%均伴有脑认知功能障碍,且在其早期就有所体现,随病程延长加重^[1]。糖尿病认知功能障碍的临床主要表现在学习和记忆能力,特别是空间定位能力的下降等,甚至发展成阿尔茨海默病,已成为全球性的医学和公共卫生问题。现已知,药物治疗在糖尿病学习记忆治疗中是必需的,但临床治疗效果并不理想,且不良反应多。最近越来越多研究认为,使用天然产物防治糖尿病学习记忆,可以产生同样的功效而不良反应少^[2]。螺旋藻是一种营养全面、均衡的纯天然食品,其生物学功能包括抗疲劳、抗衰老和免疫调节等。有关螺旋藻与糖尿病的相关研究主要集中在其降低血糖,抑制肾脏炎症信号通路抗炎^[3]等方面。最新发现,螺旋藻有抗阿尔茨海默病小鼠记忆损伤作用^[4]。而螺旋藻对糖尿病机体学习记忆的影响研究甚少。有氧运动是防治糖尿病学习记忆功能的基础。Kim等^[5]研究表明,传统有氧跑台运动可改善糖尿病大鼠的短期记忆和空间学习能力。但至目前为止,有氧运动联合螺旋藻补充对糖尿病机体学习记忆的影响则仍未阐明。

为此,本研究拟采用2型糖尿病大鼠模型,研究有氧运动和螺旋藻改善糖尿病大鼠学习记忆和对细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)和cAMP反应元件结合蛋白(cAMP-responsive element-binding protein, CREB)信号通路蛋白及海马细胞凋亡的影响,为寻找新的改善糖尿病机体学习记忆的方法和螺旋藻在运动医学领域的应用提供实验数据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级雄性SD大鼠55只,6周龄,体质量 180 ± 20 g,购自中国科学院上海实验动物中心湖南斯莱克景达实验动物公司(动物许可证号:SCXK(湘)2016-0002,使用证:SYXK(赣)2017-0003)。动物房温度 24 ± 2 °C,湿度40%~60%,光照时间12 h,分笼饲养,自由饮食饮水。

1.2 实验主要试剂与仪器

兔抗鼠多克隆抗体 p-ERK、p-CREB(美国 Proteintech 公司,试剂盒批号:14060-1-AP、55014-1-

AP);兔抗鼠多克隆抗体 ERK、CREB、cleaved Caspase-3(北京博奥森生物公司,试剂盒批号:bs-0078R、bs-1021R、bs-0081R);HRP二抗(批号:AS014,Abclonal公司);螺旋藻(深绿色粉末,纯度99.7%,国药准字:Z53020227,云南施普瑞生物公司);链脲佐菌素(批号:20171004, Sigma公司);血清胰岛素测定试剂盒(批号:20171030,中生北控生物科技股份有限公司);ApopTag[®]荧光素原位细胞凋亡检测试剂盒(批号:S7104, Millipore公司);无水葡萄糖、中性树脂(广州齐云试剂公司);血糖检测试条(批号:201701020 A1,北京怡成生物电子技术公司);葡萄糖测试仪(JPS-5型,北京怡成生物电子技术公司);一次性使用无菌采血针(天津华鸿器材有限公司);动物跑台(ZH-PT型,安徽淮北正华生物仪器设备公司);全自动生化分析仪(日立-7600);Morris水迷宫和动物行为学分析系统软件(ZH0065型,安徽淮北正华生物仪器设备公司);BX41型显微镜(OLYMPUS公司,日本);BIO RAD凝胶成像仪(Bio-Rad,美国)。

1.3 动物造模、分组与药物灌胃处理

大鼠适应性喂养1周,随机抽取10只用作对照组(control group, C),常规饲料喂养;其余45只用作制备2型糖尿病模型。模型的建立参照Reed et al^[6]方法进行。造模组(modeling group, M)改为高糖高脂饲料喂养,高糖高脂饲料配方按照文献方法^[3],由63.5%普通饲料、20%蔗糖、10%猪油、5%蛋黄粉、1%胆固醇、0.5%胆酸盐组成。5周后,行葡萄糖耐量试验和胰岛素敏感性实验后,确定存在胰岛素抵抗的大鼠经单次腹腔注射链脲佐菌素(streptozocin, STZ, 35 mg/kg·bw),以诱发2型糖尿病大鼠模型。注射STZ1周后尾静脉采血测试血糖,以随机血糖 ≥ 16.7 mmol/L,出现“三多一少”症状者为成模大鼠。共有40只大鼠成模。随机分为4组:糖尿病组(diabetes model group, DM)、运动组(diabetes exercise group, DE)、螺旋藻组(diabetes spirulina group, DS)、运动+螺旋藻组(diabetes exercise spirulina group, DES),每组10只。螺旋藻临用前用生理盐水溶解制成混悬液。灌胃组(DS、DES)按每天300 mg/kg体重给药^[3],给药体积2 mL/只,

每天灌胃螺旋藻,其余组以等体积的生理盐水灌胃。每次灌胃时间在运动前2 h内完成。实验时间连续8周。

1.4 运动方案

运动训练方案参照文献^[7]结合预实验经验进行。运动组(DE、DES)大鼠进行为期8周(每周5次,0坡度)的有氧跑台运动。训练前1周先让大鼠进行适应性跑台运动(5~10 m/min,10 min,5天/周,0坡度)。正式训练时间为第1周跑台速度从5 m/min逐渐增加到15 m/min;第2周从16 m/min增加到22 m/min,以后每周跑速增加2 m/min,每次运动时间持续40 min,持续训练8周。同时,C组、DM组和DS组不运动,正常环境饲养8周。

1.5 Morris水迷宫实验

采用Morris水迷宫(ZH0065型,淮北正华生物仪器设备公司)测定各组的逃避潜伏期和穿越平台次数,检测大鼠学习记忆能力。水迷宫为圆形水池(直径150 cm、高60 cm、水深32 cm,水温 22 ± 2 °C)。分别于造模成功干预前、干预后进行大鼠学习记忆能力测试。①定位航行实验:将大鼠面向池壁,分别随机从东、西、南、北4个象限池的中点入水开始计时,以大鼠找到平台2 s终止记录,此时间为逃避潜伏期。每只大鼠每天训练2次,连续训练5天,第6天进行定位航行测验,取3次潜伏期的平均值作为逃避潜伏期。②空间探索实验:在定位航行实验结束后的第2天撤去平台,随机选取一个入水点将大鼠面向池壁放入水池中,摄像系统自动记录大鼠120 s内的游泳轨迹,记录穿越平台的次数,评价大鼠空间学习记忆能力。

1.6 实验取材与指标检测

1.6.1 口服葡萄糖耐量试验(oral glucose tolerance test, OGTT)

高糖高脂饲料5周后,从C组和M组随机分别选出大鼠6只,隔夜禁食12 h,尾静脉采血,擦掉第一滴血后测定空腹血糖和胰岛素水平,随后以2 g/kg bw的葡萄糖剂量对两组大鼠进行灌胃处理。在灌胃后的30、60、120 min^[8]尾静脉采血测定血糖和胰岛素的水平。

1.6.2 血糖和胰岛素水平的测定

行为学实验结束后,各组大鼠夜间禁食(不禁水)12 h,尾静脉采血。空腹血糖测定采用葡萄糖氧化酶法。血清胰岛素检测采用胶乳免疫比浊法,检测方法严格按试剂盒说明书进行。

1.6.3 TUNEL染色

大鼠以10%水合氯醛腹腔麻醉,暴露心脏,灌流针经心从左心室插管至主动脉弓,同时剪开右心耳,放静脉血。常规方法灌注(先灌注生理盐水,待肝脏变白时改灌注4%多聚甲醛100 mL)完毕后,断头,取全脑,放入多聚甲醛溶液(4%)中固定24 h以上,石蜡包埋。严格按照ApopTag[®]荧光素原位细胞凋亡检测试剂盒操作步骤进行海马神经细胞凋亡检测。行DAPI染色,出现蓝色荧光的代表神经细胞核,绿色荧光代表凋亡细胞。荧光显微镜下拍照采集图像,每张图片选取5个视野,将所得结果用Image.J图像处理软件计数分析。细胞凋亡率=(绿色荧光的凋亡细胞数/总细胞数)×100%。

1.6.4 Western blot法

大鼠麻醉,断头取全脑,冰浴上分离海马组织,分装标记,置-80 °C冰箱保存。冻存的海马组织取出,称量后放入匀浆器,加入重量为组织9倍的细胞裂解液。在冰上研磨约12 min,充分研磨破碎,搜集样品于离心管中,离心(4 °C,12 000 rpm,10 min),取上清液。用BCA法将样品进行蛋白定量,常规方法聚丙烯酰胺凝胶电泳后,将胶上蛋白转移至PVDF膜上,室温下封闭(用5%的脱脂奶)2.0 h,加一抗(ERK、p-ERK、CREB、p-CREB、cleaved caspase-3抗体工作浓度分别为1:500、1:1 500、1:500、1:2 000、1:300),加入HRP标记的二抗(1:5 000),洗膜、显影、定影、曝光,洗片,采用凝胶电泳成像分析系统分析。以GAPDH作为内参,计算p-ERK/ERK、p-CREB/CREB的比值,反映ERK、CREB的活化程度和cleaved caspase-3蛋白的相对表达量。

1.7 数据处理

实验数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用SPSS Statistics 16.0统计软件对相关数据进行分析。统计学方法包括多组间比较采用One-Way ANOVA法,两组间比较用两样本均数 t 检验法。

根据2×2析因设计的方差分析,将DM、DE、DS、DES组大鼠的cleaved caspase-3、p-ERK/ERK、p-CREB/CREB、细胞凋亡率、体重、血糖、血胰岛素和学习记忆相关指标等数据纳入分析。 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 实验结果

2.1 造模期间大鼠OGTT后血糖、血胰岛素水平、分组时血糖及一般情况的变化

如表1和表2所示,与C组对应时间点比较,高

糖高脂饲料喂养 5 周的 M 组模型大鼠 OGTT 试验后的 30、60、120 min 的血糖浓度和血胰岛素水平均明显升高, 差异有显著性 ($P < 0.01$)。如图 1 所示, 动物分组时 C 组和 M 组模型大鼠血糖检测值分别为 6.01 ± 0.64 和 19.98 ± 2.15 , 组间比较差异呈极

显著性 ($P < 0.01$)。同时实验期间模型大鼠多食、多尿、多饮和体重减轻症状日趋明显; 出现毛发稀疏色泽黄枯无光泽, 大便稀溏, 行动迟缓等状态; 且垫料易湿, 每天更换至少 2~3 次。

表 1 两组大鼠 OGTT 后血糖浓度的变化 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Changes of blood glucose after OGTT in the groups of rats ($\bar{x} \pm s, n=6$) (mmol/L)

组别 Group	空腹血糖 Fasting blood glucose	OGTT 后 30 min 30 min after OGTT	OGTT 后 60 min 60 min after OGTT	OGTT 后 120 min 120 min after OGTT
C	6.1 ± 0.59	7.82 ± 1.11	7.30 ± 0.90	6.50 ± 0.67
M	$9.20 \pm 3.37^*$	$21.88 \pm 5.55^{**}$	$17.83 \pm 4.65^{**}$	$15.58 \pm 3.99^{**}$

注: 与 C 组对应时间点比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。下同。

Note: Compared with the same time of group C, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. The same below.

表 2 两组大鼠 OGTT 后血胰岛素水平的变化 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Changes of serum insulin after OGTT in the groups of rats ($\bar{x} \pm s, n=6$) (mIU/L)

组别 Group	空腹胰岛素 Fasting insulin	OGTT 后 30min 30 min after OGTT	OGTT 后 60min 60 min after OGTT	OGTT 后 120min 120 min after OGTT
C	17.24 ± 3.51	18.28 ± 4.67	18.25 ± 3.34	17.57 ± 2.24
M	$24.97 \pm 3.23^*$	$27.95 \pm 4.23^{**}$	$30.79 \pm 4.20^{**}$	$29.94 \pm 3.43^{**}$

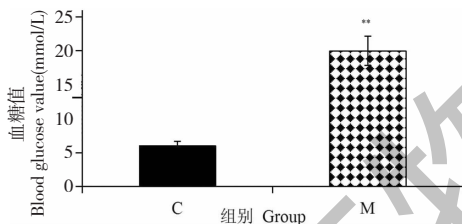


图 1 分组时两组大鼠血糖浓度的变化 (C 组: $n=10$, M 组: $n=40$)

Fig. 1 Changes of blood glucose of rats in the two groups (group C: $n=10$, group M: $n=40$)

注: 与 C 组比较, ** $P < 0.01$ 。Note: Compare with group C, ** $P < 0.01$ 。

表 3 大鼠空腹体重、血糖和血胰岛素水平的变化 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Changes of fasting weight, blood glucose and serum insulin of rats among groups ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别 Group	体重 Weight (g)	血糖 Blood glucose (mmol/L)	血清胰岛素 Serum insulin (mIU/L)
C	420.47 ± 22.98	5.88 ± 0.89	17.43 ± 4.69
DM	$348.84 \pm 23.96^{**}$	$27.35 \pm 4.25^{**}$	$35.83 \pm 7.52^{**}$
DE	$354.40 \pm 33.12^{**}$	$22.18 \pm 4.59^{**\#}$	$26.97 \pm 6.55^{**\#}$
DS	$360.58 \pm 28.20^{**}$	$21.52 \pm 4.38^{**\#}$	$27.28 \pm 6.31^{**\#}$
DES	$362.81 \pm 28.62^{**}$	$16.22 \pm 3.36^{**\#\#\Delta}$	$19.62 \pm 5.00^{\#\#\Delta}$

注: 与 C 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 DM 组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与 DE 组相比, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与 DS 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。下同。

Note: Compared with group C, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with group DM, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; Compared with group DE, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; Compared with group DS, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. The same below.

2.2 运动及螺旋藻对大鼠体重、血糖浓度和胰岛素水平的影响

由表 3 所示, 与 C 组相比, DM 组血糖和胰岛素水平均显著升高, 而其体重明显下降 ($P < 0.01$); 与 DM 组相比, DE、DS、DES 组的血糖和胰岛素检测值均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其体重虽有增加趋势, 但显著性差异不明显 ($P > 0.05$)。与 DE、DS 组相比, DES 组的血糖和胰岛素水平明显降低 ($P < 0.05$), 但其血糖值仍显著高于 C 组 ($P < 0.01$); 其血胰岛素水平则稍高于 C 组 ($P > 0.05$); 其体重虽有增加, 但增加亦不明显 ($P > 0.05$)。

2.3 运动及螺旋藻对大鼠行为学的影响

由表4和图2所示,实验前5组大鼠逃避潜伏期、穿越平台次数均无显著性差异($P > 0.05$)。实验后,与C组相比,DM组大鼠逃避潜伏期明显延长($P < 0.01$),穿越平台次数减少($P < 0.01$);且DM组的行为学轨迹比C组更紊乱,更难找到目标平台,主要以边缘式为主。与DM组相比,DE、DS、DES组的逃避潜伏期均缩短($P < 0.05$ 或 $P <$

0.01),穿越平台次数均增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);其行为学轨迹比DM组简单,较容易发现目标平台,主要以直线式和趋向式为主。与DE、DS组相比,DES组的逃避潜伏期明显缩短($P < 0.05$),穿越平台次数显著增多($P < 0.05$)。各组大鼠呈现不同特点的运动轨迹,C组以直线式为主,DM组以边缘式为主,其余各组主要以直线式和趋向式为主。

表4 大鼠逃避潜伏期和穿越平台次数的变化($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Changes of learning and memory functions among groups before and after experiment ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	成模后干预前 Before the experiment		成模后干预后 After the experiment	
	逃避潜伏期 Escape latency (s)	穿越平台次数 Numbers of plateau crossing	逃避潜伏期 Escape latency (s)	穿越平台次数 Numbers of plateau crossing
C	21.02 ± 3.98	3.80 ± 0.45	10.67 ± 2.31	8.83 ± 1.65
DM	20.40 ± 4.11	4.01 ± 0.64	18.95 ± 3.52**	4.78 ± 0.44**
DE	19.69 ± 4.89	3.94 ± 0.82	14.90 ± 3.82**	6.02 ± 0.77***
DS	19.97 ± 5.16	4.12 ± 0.51	14.72 ± 3.35**	6.12 ± 0.54***
DES	20.35 ± 5.94	4.24 ± 0.95	10.82 ± 2.64###△*	7.57 ± 1.07***△*

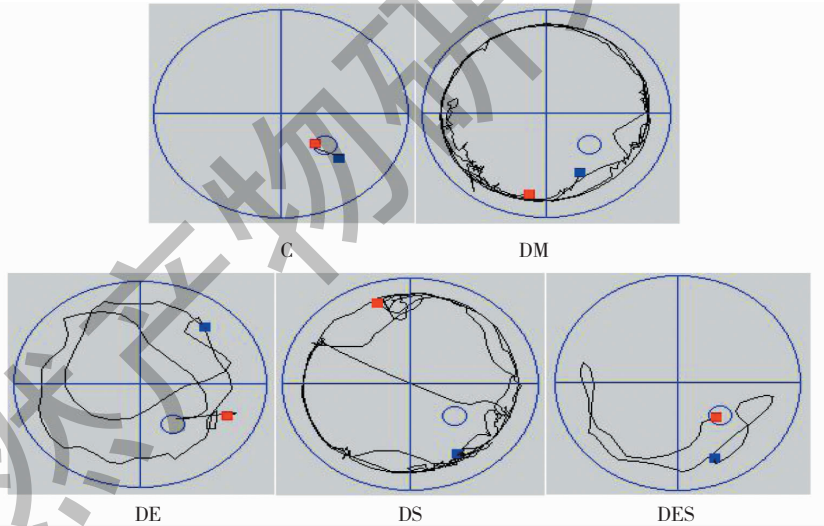


图2 各组大鼠水迷宫轨迹图

Fig. 2 The typical swimming track of rats in the groups

注:蓝色圆为隐蔽平台;蓝方块为游泳轨迹起点;红方块为游泳轨迹终点。Note: The blue circles are the hidden platforms; The blue squares are the starting points; The red squares are the end points.

2.4 运动及螺旋藻对大鼠海马神经元凋亡率的影响

图3中,绿色荧光代表断裂或凋亡的DNA,蓝色荧光代表细胞核。与C组相比,DM组和DE、DS、DES各干预组海马神经元细胞凋亡率均明显增加($P < 0.01$);与DM组相比,干预各组细胞凋亡率均

明显降低($P < 0.01$);其中以DES组降低尤为明显,均低于DE组和DS组($P < 0.05$,见图4)。

2.5 运动及螺旋藻对大鼠海马组织相关信号通路蛋白表达的影响

由图5、表5可见,各组大鼠海马组织中ERK和CREB总量没有明显差异。与C组相比,DM组大鼠

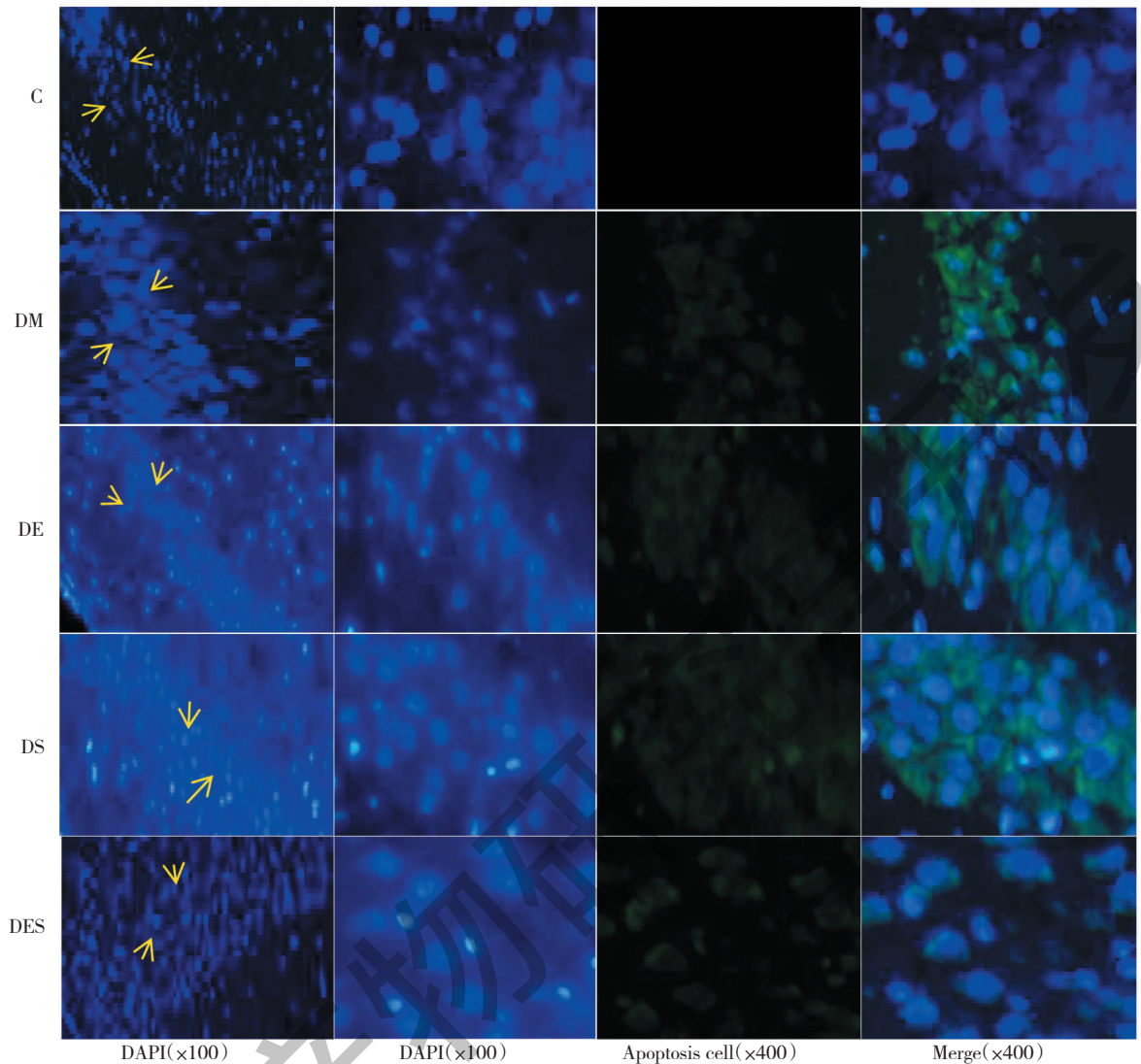


图3 各组大鼠海马组织 TUNEL 染色结果

Fig. 3 The results of TUNEL staining in the hippocampus of rats in the groups

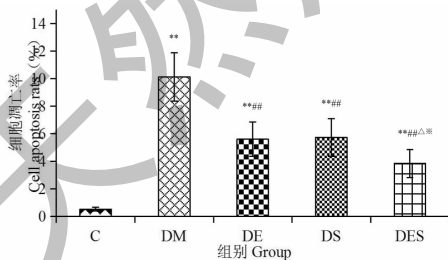


图4 大鼠海马神经元细胞凋亡率的变化 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 4 Changes of cell apoptosis rate of rats in hippocampal among groups ($\bar{x} \pm s, n=6$)

海马组织 p-ERK/ERK、p-CREB/CREB 水平均明显下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), cleaved caspase-3 表达

则明显增加 ($P < 0.01$)。与 DM 组相比, DE、DS、DES 组 p-ERK/ERK、p-CREB/CREB 均明显增加 ($P < 0.01$), cleaved caspase-3 表达则显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与 DE、DS 组相比, DES 组的 p-ERK/ERK、p-CREB/CREB 水平均显著增加 ($P < 0.05$), cleaved caspase-3 蛋白明显减少 ($P < 0.01$)。

3 讨论与结论

口服葡萄糖耐量试验 (OGTT) 是目前评价糖代谢状况的金标准, 同时也是临床评估胰岛 β 细胞功能及胰岛素敏感性的常用方法。本研究参照 Hou 等^[9]的方法, 对 5 周高脂喂养的大鼠行 OGTT 试验, 发现大鼠出现空腹高血糖和高胰岛素血症, 表明大鼠出现糖耐量受损和胰岛素抵抗。再配合注射 STZ

表5 大鼠海马组织相关信号通路蛋白表达量($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 5 Expressions of related signaling pathway proteins in hippocampal of rats among groups($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别 Group	p-ERK/ERK	p-CREB/CREB	Cleaved caspase-3
C	1.418 ± 0.234	1.415 ± 0.162	0.080 ± 0.010
DM	0.491 ± 0.054 * *	1.044 ± 0.091 *	1.103 ± 0.193 * *
DE	0.910 ± 0.080 * * * #	1.914 ± 0.348 * * * #	0.902 ± 0.090 * * #
DS	0.917 ± 0.072 * * * #	1.762 ± 0.114 * * # Δ	0.838 ± 0.035 * * #
DES	1.138 ± 0.079 * * # Δ *	2.219 ± 0.081 * * * # Δ *	0.135 ± 0.014 # # Δ Δ * *

选择性破坏胰岛β细胞,1周后,模型大鼠多饮、多食、多尿症状日趋明显,同时实验期间大鼠出现体重减轻,毛发稀疏色泽黄枯无光泽,大便稀溏,行动迟缓等状态。经8周的实验周期,2型糖尿病模型鼠仍出现高血糖、高胰岛素血症的主要临床特征,表明2型糖尿病大鼠模型已诱导成功^[9]。而实验期间模型鼠胰岛素水平较高的原因可能与其靶细胞膜上的胰岛素受体含量减少,胰岛素作用效率降低,机体代偿分泌过多胰岛素等有关。8周有氧运动能够降低大鼠血糖和胰岛素水平,但对体重影响不明显,原因可能与规律运动能增加糖尿病大鼠骨骼肌胰岛素受体敏感性、促进骨骼肌对葡萄糖的直接摄取,降低血糖有关;而这种作用并不依赖体重的下降。

研究证实,高脂饮食和STZ诱导的糖尿病模型大鼠存在学习记忆障碍^[10]。Morris水迷宫检测结果同样表明,本研究诱发的高血糖2型糖尿病大鼠出现了空间学习记忆能力的明显下降,与前人研究相一致^[10]。动物研究证实,高血糖可引起细胞凋亡。本研究发现,与对照组比较,高血糖模型大鼠海马细胞凋亡率明显增多,说明糖尿病高糖状态导致海马细胞凋亡增加更为显著^[11],与前人一致。同时大鼠逃避潜伏期明显延长,穿越平台次数显著减少,表明糖尿病学习记忆能力的下降与海马神经元的凋亡密切相关。有氧运动有抗海马细胞凋亡损伤作用^[11]。8周跑台运动后,模型鼠海马细胞凋亡率明显减少,学习记忆功能得到改善,表明长时间有氧运动有抗海马细胞凋亡损伤,增强糖尿病学习记忆的作用,这可能与其降血糖作用有关^[11]。

近年来,神经系统中信号传导通路的变化与学习记忆关系的研究已成为新的研究热点。ERK广泛分布在中枢神经系统,在海马、纹状体、前额叶皮质等区域都有显著表达,与学习记忆密切相关。CREB是一种具有调节基因转录功能的核内蛋白质,CREB是ERK最重要的下游信号分子之一,活

化的ERK通过激活下游CREB的表达,调节突触可塑性,改善大脑学习记忆能力^[12]。细胞内ERK/CREB信号通路在调控大脑学习记忆能力和突触可塑性的过程中起着“开关”作用^[13]。信号分子磷酸化是信号通路激活的方式。本研究结果显示,与对照组比较,模型大鼠p-ERK/ERK、p-CREB/CREB水平明显降低,提示,糖尿病高血糖状态可引起ERK/CREB信号下调。有氧跑台运动后,模型大鼠p-ERK/ERK、p-CREB/CREB水平明显增加,提示适量运动可影响ERK/CREB信号蛋白表达,修复海马神经元损伤^[14],改善学习记忆。有氧运动是一种对海马和神经突触有直接影响的非药理学方法。长时间的有氧运动能够促进ERK、CREB等海马记忆相关蛋白表达,达到修复海马神经元细胞损伤^[14],改善学习记忆的效果。研究又表明,CREB表达沉默可促进氧糖剥夺/复氧皮层神经元的凋亡^[15]。ERK、CREB信号通路蛋白表达上调均有抗细胞凋亡效应^[15,16],通过此途径而达到脑保护作用。ERK信号途径可能是多种海马突触可塑性诱导的共同机制^[16,17]。半胱氨酸蛋白酶3(cysteinyI aspartate specific proteinase-3, caspase-3)是细胞凋亡的驱动器和关键执行分子,其活化是细胞程序性死亡中细胞蛋白裂解的一个重要环节。本研究显示的有氧运动有上调ERK/CREB信号,减少活化凋亡酶(cleaved caspase-3)表达,抑制细胞凋亡发生的作用。由此推测本实验条件下的有氧运动可能通过降低血糖,上调ERK/CREB信号通路,减少cleaved caspase-3表达,增强海马抗细胞凋亡能力,促进海马神经元修复,从而防止与糖尿病有关的空间学习与记忆能力的减退。目前有关ERK/CREB信号与有氧运动抗糖尿病学习记忆的研究甚少。ERK/CREB信号介导的抗海马细胞凋亡效应可能是运动改善糖尿病学习记忆的神经保护机制之一。

螺旋藻具有降血糖、抗氧化等多种功能,被称为

21 世纪人类蛋白质的来源,目前许多国家将螺旋藻制成营养保健食品,用于补充人体营养需要及各种疾病(如糖尿病、高血压等)的防治。近来研究发现,螺旋藻有增强记忆力、抗记忆损伤的神经保护作用,其机制与其增加 nNOS 的表达,抑制 GSK-3 β 蛋白的表达,改善由 A β ₁₋₄₂ 蛋白沉积引起的大鼠脑认知功能障碍等有关^[18,19]。而有关螺旋藻改善糖尿病机体学习记忆方面的报道尚无。螺旋藻能否通过降血糖影响 ERK/CREB 信号通路来改善或提高糖尿病大鼠学习记忆,目前研究尚不清楚。

本研究显示,螺旋藻补充后,糖尿病模型大鼠学习记忆明显提高,同时血糖和胰岛素含量下降,海马 ERK/CREB 信号均明显上调,cleaved caspase-3 和细胞凋亡率显著减少,提示,螺旋藻改善学习记忆可能与其降血糖、修复受损胰岛细胞功能的生物学作用有关,其机理可能是通过增强海马 ERK/CREB 信号,抑制海马细胞凋亡实现。前期研究发现^[3],螺旋藻有上调海马(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)信号,改善运动疲劳模型大鼠海马损伤的作用。脑源性神经营养因子(BDNF)与其受体(tyrosine kinase receptor B, TrkB)结合,可以通过激活 ERK 来诱导 CREB 的激活并产生持续的 CREB 信号;增强 BDNF/TrkB 的 ERK/CREB 信号有利于海马学习记忆的改善^[20]。在 app/ps1 小鼠的研究中发现, β 淀粉样蛋白水平的增加下调了 CREB 的磷酸化,导致海马 BDNF 诱导的 TrkB 自磷酸化下调,由 ERK 激活的 CREB 表达降低^[21],会引起学习、记忆能力的减退。螺旋藻能明显上调 ERK、CREB 等海马神经元学习记忆关键信号分子,一定程度抑制细胞凋亡,这可能是其新的抗糖尿病学习记忆损伤的脑保护作用机制之一。

研究进一步发现,运动联合螺旋藻 8 周后,糖尿病大鼠学习记忆改善的效果也优于单一的有氧运动与螺旋藻组,表明运动螺旋藻联用具有协同增效作用。运动疗法作为药物治疗的补充具有良好的应用前景。有氧运动螺旋藻联用的增强效果与有氧运动联合白藜芦醇给药在 2 型糖尿病模型中发挥神经保护作用相一致^[11]。机制研究表明,运动螺旋藻联合组的 p-ERK/ERK、p-CREB/CREB 水平显著高于单一的有氧运动与螺旋藻组,cleaved caspase-3 表达显著降低,细胞凋亡率明显减少,提示,运动联合螺旋藻补充可能通过进一步激活 ERK/CREB 信号途径,促进海马记忆关键蛋白 ERK 和 CREB 的活化,有效

抑制海马细胞凋亡,从而发挥降血糖,改善糖尿病大鼠学习记忆的神经保护作用。这有可能是运动联合螺旋藻提高糖尿病学习记忆的重要原因。运动联合营养补充有可能成为改善糖尿病相关神经退行性疾病学习记忆的新途径。

值得说明的是,本研究中的 DES 组的胰岛素水平在干预后期(第 8 周)已基本恢复至正常水平,而其血糖浓度虽有明显的改善,但仍显著高于正常水平,提示,糖尿病是一种持续进展性疾病,运动和螺旋藻不能在有限的时间内把血糖恢复到正常状态,但可以修复受损的胰岛细胞功能,使胰岛素分泌趋于正常。建议 2 型糖尿病患者需长期坚持规律的有氧运动,同时注意膳食中螺旋藻的适当补充。

由此可见,在本实验条件下,有氧运动和螺旋藻能有效降血糖,改善 2 型糖尿病大鼠学习记忆,且运动联合螺旋藻方案有更明显的应用效果,优于单纯的有氧运动和螺旋藻,其机制与其上调海马 ERK/CREB 信号,减少 cleaved caspase-3 表达,一定程度抑制细胞凋亡,发挥海马神经保护作用有关。ERK/CREB 信号途径有可能成为有氧运动和螺旋藻改善糖尿病机体海马学习记忆的潜在靶点。

参考文献

- 1 Mccrimmon RJ, Ryan CM, Frier BM. Diabetes and cognitive dysfunction[J]. Lancet, 2012, 379: 2291-2299.
- 2 Ugwuja EI, Nwibo AN, Ugwu NC, et al. Effect of aqueous extract of spices mixture containing curry, garlic and ginger on plasma glucose and lipid in alloxan-induced diabetic rats [J]. Pak J Nutr, 2010, 9: 1131-1135.
- 3 Zhu HZ, Zhu MJ, Zeng ZG, et al. Effects of aerobic exercise plus spirulina supplement on the expression of TLR4/NF- κ B-p65 and inflammatory factor in kidney tissue of type 2 diabetes rats[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2017, 29: 1119-1126.
- 4 Lin ZJ, Chen YS, Zhong WT, et al. Effect of spirulina polysaccharide on activity of mitochondrial respiratory chain enzyme in Alzheimer's disease model mice [J]. Chin J Brain Dis Rehabil(中华脑科疾病与康复杂志), 2016, 6(2): 79-82.
- 5 Kim DY, Jung SY, Kim K, et al. Treadmill exercise ameliorates Alzheimer disease-associated memory loss through the Wnt signaling pathway in the streptozotocin-induced diabetic rats[J]. J Exe Rehabil, 2016, 12: 276-283.
- 6 Reed MJ, Meszaros K, Entes LJ, et al. A new rat model of type 2 diabetes: the fat fed, streptozotocin treated rat [J].

- Metabolism,2000,49:1390-1394.
- 7 Zhao J, Chu YJ, Fu F, et al. Effects of treadmill exercise on learning, memory, inflammation, and NGF expression in the hippocampus of diabetic rats[J]. Chin J Comp Med(中国比较医学杂志), 2020, 30(11): 65-71.
 - 8 Tian CY, Bo HM, Cao Y, et al. Effect and mechanism of zishenqinggan prescription on type 2 diabetes model rat[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2017, 29: 1851-1857.
 - 9 Hou GX, Xiao GQ. The role of exercising in improving the myocardial fibrosis of diabetic rats and its possible mechanism[J]. J Phys Educ(体育学刊), 2013, 20(2): 130-134.
 - 10 Li J, Liu Y, Liu B, et al. Mechanisms of aerobic exercise up-regulating the expression of hippocampal synaptic plasticity-associated proteins in diabetic rats[J]. Neural Plast, 2019: 7920540.
 - 11 Li H, Wang ST, Chang Y. The Effects of aerobic exercise and oral resveratrol on hippocampal neuron apoptosis in diabetic rats[J]. Chin Sport Sci Tech(中国体育科技), 2018, 54(5): 77-87.
 - 12 Li YY, Lin YK, Huang XX. SCM-198 protects endometrial stromal cells from oxidative damage through Bax/Bcl-2 and ERK signaling pathways [J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2019, 51: 580-587.
 - 13 Ren LJ, Wu BH, Liu LM, et al. High frequency repeated transcranial magnetic stimulation improves learning and memory of global cerebral ischemia rats and its mechanism[J]. Chin J Neurol(中华神经科杂志), 2019, 52: 537-542.
 - 14 Li YR, Lan SI, Jin Q, et al. Effects of aerobic exercise on the hippocampus and prefrontal cortex ERK/CREB/BDNF signal pathway in rats[J]. J Shaoguan Univ: Nat Sci(韶关学院学报: 自科版), 2019, 40(6): 87-91.
 - 15 Wang L, Chu FX, Geng HX, et al. Effect of CREB-shRNA on mitochondrial morphology and cell apoptosis in OGD/R-induced cortical neurons[J]. Chin J Pathophysiol(中国病理生理杂志), 2017, 33: 1487-1493.
 - 16 Patterson MA, Szatmari EM, Yasuda R. RAMP receptors are exocytosed in stimulated spines and adjacent dendrites in a Ras-ERK-dependent manner during long-term potentiation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107: 15951-15956.
 - 17 Harvey CD, Yasuda R, Zhong H, et al. The spread of Ras activity triggered by activation of a single dendritic spine[J]. Sci, 2008, 321(5885): 136-140.
 - 18 He L, Ren P, Zhong Y. The mechanism of ameliorative effects of spirulina on learning-memory impairment of mice induced by aluminium[J]. Chin J Clin Rehabil(中国临床康复), 2003, 7: 390-391.
 - 19 Koh EJ, Kim KJ, Song JH, et al. Spirulina maxima extract ameliorates learning and memory impairments via inhibiting GSK-3 β phosphorylation induced by intracerebroventricular injection of amyloid- β_{1-42} in mice[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(11): 2401.
 - 20 Meng CB, He ZY, Xing D. Low-level laser therapy rescues dendrite atrophy via up-regulating BDNF expression; implications for Alzheimer's disease [J]. J Neurosci, 2013, 33: 13505-13517.
 - 21 Li N, Liu GT. The novel squamosamide derivative FLZ enhances BDNF/TrkB/CREB signaling and inhibits neuronal apoptosis in APP/PS1 mice[J]. Acta Pharmacol Sin, 2010, 31: 265-272.

(上接第 1870 页)

- 13 Cheng ZH, Wu T, Li LZ, et al. Studies on the liposoluble components from tuber of *Ophiopogon japonicas* [J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2005, 40: 337-341.
- 14 Song FH, Fan X, Xu XL, et al. Studies on chemical constituents of the brown alga *Dictyopteris divaricate* [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2006, 31: 125-128.
- 15 Jin L, Zhang CC, Huang ZH. Chemical constituents from sporophore of *Phellinus lonicerinus* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2016, 22(24): 55-58.
- 16 Wu XL, Lin S, Zhu CG, et al. Studies on constituents of cultures of fungus *Phellinus igniarius* [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2011, 36: 874-880.