

高糖高脂饮食诱导大鼠代谢综合征模型并发阿尔茨海默样变

牛利^{1,2}, 韩德五², 许瑞龄^{1,2}, 周鑫^{1,2}, 屈重霄³

(1. 山西医科大学病理生理学教研室, 太原 030001; 2. 山西医科大学肝病研究所, 太原 030001;
3. 山西省人民医院病理科, 太原 030012)

【摘要】 目的 通过长期高糖高脂饮食导致动物出现代谢综合征合并阿尔茨海默(AD)样改变动物模型的研究。方法 将48只SD大鼠随机分为2组,正常对照组(用普通饲料饲喂)24只,高糖高脂组(饲以高糖高脂饲料)24只,连续喂养12个月。于实验第6、9、12月末观察动物体重、肾周和附睾或子宫周围脂肪重量并计算Lee指数;检测血液中代谢综合征相关生化指标的变化;Western blotting测定海马Tau蛋白含量及其磷酸化水平;ELISA法检测海马A β 的含量;HE染色观察脑组织病理改变。结果 与正常对照组相比,各阶段高糖高脂组大鼠体重、内脏脂肪重量明显增加;血清中FPG、TG、LDL等明显升高,HDL显著下降;海马A β 、P-tau较对照组明显升高,其差异有统计学意义;病理组织学显示模型组脑组织有明显的炎症浸润、小胶质细胞活化明显。结论 高糖高脂饮食诱导大鼠代谢综合征动物模型可并发AD样变,可为老年痴呆动物模型的构建提供一个新思路。

【关键词】 阿尔茨海默病;代谢综合征;炎症;胰岛素抵抗;高糖高脂

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 08-0027-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.008.006

Alzheimer's disease-like lesions may occur in and accompany the high-sugar high-fat diet-induced rat models of metabolic syndrome

NIU Li^{1,2}, HAN De-wu², XU Rui-ling^{1,2}, ZHOU Xin^{1,2}, QU Chong-xiao³

(1. Department of Pathophysiology, 2. Institute of Liver Disease, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China;
3. Department of Pathology, People's Hospital of Shanxi Province, Taiyuan 030012)

【Abstract】 Objectives To explore the relativity between Alzheimer's disease (AD)-like lesions and metabolic syndrome models induced by high-sugar high-fat diet in rats. **Methods** Forty-eight Sprague Dawley rats were randomly divided into 2 groups. The control group (fed with normal diet, 12 rats) and high sugar and high fat group (fed with high-sucrose and high-fat diet, 12 rats) continuously for 12 months. At the end of 6, 9 and 12 months of the experiment, we observed the animal body weight and visceral fat weight. The blood lipid levels, blood glucose and MS-related biochemical parameters were determined. The brain tissues were examined by histopathology. The characteristic AD molecules hippocampus A β and Tau were detected using ELISA and Western blotting to confirm the presence of AD lesions in the brain. **Results** Compared with the normal control group, the body weight and visceral fat weight of the rats in the high-sugar high-fat groups were significantly increased; the levels of TG, FPG, LDL, HOMA-IR and hippocampus A β ,

【基金项目】 国家自然科学基金青年基金(No. 81302220);山西省自然科学基金(编号:2014021040-3)。

【作者简介】 牛利(1976-),女,讲师,研究方向:代谢综合征与老年痴呆。E-mail: nly2004@163.com。

【通讯作者】 韩德五(1934-),男,教授,研究方向:肠源性内毒素血症与代谢综合征。Email: 535574141@qq.com。

phosphorylated Tau (p-Tau) were higher, but the level of HDL was decreased ($P < 0.05$ for all). The histopathological examination revealed inflammatory cell infiltration in the brain tissues. **Conclusions** Characteristic AD-like lesions may occur and accompany the rat models of metabolic syndrome, induced by high-sugar high-fat diet, and provide a new idea for the construction of Alzheimer's disease animal models.

【Key words】 Metabolic syndrome; Alzheimer's disease, sporadic; Inflammation; Insulin resistance; High-sugar high-fat diet; Rats

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种中枢神经系统原发性退行性疾病, 本病起病缓慢隐匿, 病程呈进行性, 病因迄今未明。AD 患者最典型的临床表现是学习、记忆和认知功能的进行性减退, 其海马组织中 tau 蛋白过度磷酸化和 $A\beta$ 聚集形成 SP, 被认为是 AD 特征性病理改变^[1]。AD 中, 5% 的病例为家族性 AD (FAD), 95% 的病例为散发性 AD (SAD)^[2]。SAD 是一种与年龄密切相关的疾病, 是遗传与环境相互作用的结果, 但其确切原因和发病机制目前尚不明确。对于 AD 的研究目前大多采用转基因动物, 但其无法模拟人类缓慢发病的进程, 因此有着的局一定的限性。

代谢综合征 (MS) 是以胰岛素抵抗为核心的各种代谢疾病的总称, 是糖代谢异常、2 型糖尿病、高血压、脂代谢紊乱、腹型肥胖, 高胰岛素血症等多种代谢异常集簇发生在某一个体的异常病理生理现象。大量的研究表明, 与代谢综合征相关的糖尿病、高血压、肥胖等往往是 AD 潜在的独立危险因素^[3,4], 故代谢紊乱可能是 AD 发病的始动因子^[5]。本课题组采用高糖高脂膳食喂养大鼠一年, 成功复制出肥胖、非酒精性脂肪性肝病、二型糖尿病、代谢性心肌病等代谢综合征相关疾病的动物模型^[6]。本实验在此工作基础上, 对高糖高脂诱导的代谢综合征大鼠模型的脑组织的相关指标进行测试和分析, 力求寻找 AD 与代谢综合征的早期联系。

1 材料和方法

1.1 实验动物

Sprague-Dawley 大鼠 48 只, 雌雄各半, 山西医科大学动物实验中心提供, 生产许可证: SCXK(晋)2009-0001, 动物使用许可证: SYXK(晋)2009-0004。

1.2 主要试剂和仪器

甘油三酯 (triglyceride, TG) 试剂盒、低密度脂蛋白 (LDL) 试剂盒、高密度脂蛋白 (HDL) 试剂盒等购自中生北控公司; $A\beta$ ELISA 试剂盒购自 R&D; Tau、P-tau 抗体购自 Cell Signaling Technology; 721 分光光度计购自上海第三分析仪器厂; SN-684 型

放免 γ 计数器购自上海核所日环光电仪器有限公司。

1.3 动物分组及模型的建立

48 只大鼠适应性饲养 1 周后, 随机分为 6 组: 6 月、9 月、12 月正常对照组, 每组 8 只, 以正常饮食喂养; 6 月、9 月、12 月高糖高脂组, 每组 8 只, 采用高糖高脂膳食 (70% 正常饲料 + 20% 猪油 + 10% 蔗糖 + 1% 胆固醇 + 0.25% 胆酸) 喂养。正常组总热量 13.89 KJ/g, 模型组总热量 68.40 KJ/g。以上动物均于天黑前投食, 自由饮水, 每月末称体重 1 次。分别于实验第 6 月末、9 月末、12 月末取相应阶段的正常组及高糖高脂组大鼠, 腹主动脉采血, 3 500 r/min 离心备用; 断头处死, 取脑组织一半于 10% 中性甲醛固定液中固定, 石蜡包埋切片。另一半冻存于 -70°C 冰箱待用。

1.4 生化指标检测

严格按照试剂盒说明书进行。计算胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR): $\text{HOMA-IR} = (\text{FPG} \times \text{FINS}) / 22.5$ 。

1.5 病理学检查

10% 中性甲醛溶液固定脑组织进行 HE 染色, 光镜下观察脑组织病理学改变。

1.6 蛋白质印迹技术检测海马内 Tau、P-tau 蛋白的水平

取冻存的海马组织分别置于玻璃匀浆器内, 加入蛋白裂解液在冰浴中反复研磨, 裂解 30 min, 于 4°C 离心机内 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液即为蛋白, 取 10 μL 用 Bradford 法检测蛋白浓度, 其余储存于 -80°C 备用, 调整各上样量 40 $\mu\text{L}/\text{well}$, 用前加 2 \times 样本缓冲液并混匀, 于 100°C 变性 5 min, 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 4°C PVDF 转膜过夜, 摇床上 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h; 分别与目的抗体 4°C 杂交过夜; PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; 杂交 2 抗 (辣根酶标记的羊抗兔), 室温摇床上孵育 2 h; PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; 加入发光液、曝光、显影, 采用 Quantity One (Bio-Rad Laboratories) 对胶片进行灰度分析。

1.7 统计学方法

用 SPSS13.0 统计软件,数值以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,正常组与模型组之间的比较用两独立样本 T 检验,模型组间比较用单因素方差分析及组间比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠体重及内脏脂肪重量的变化

实验期间,各组大鼠均状态良好。各阶段模型组大鼠与正常组大鼠相比,体重及内脏脂肪重量(用肾周和附睾或子宫周围脂肪组织代表内脏脂肪)均明显增加 ($P < 0.05$),且 Lees 指数 $\sqrt[3]{\frac{weight \times 10^3}{length(cm)}}$,也较对照组明显升高(图 1)。提示经过高糖高脂膳食喂养后动物可发生肥胖以及内脏脂肪的增加。

2.2 代谢综合征相关指标的变化

模型组大鼠 TG、LDL、FPG、HOMA-IR 等都明显升高 ($P < 0.05$),HDL 则明显降低。说明经过高糖高脂喂养后,动物出现了糖代谢异常,高甘油三酯血症,异常脂蛋白血症及胰岛素抵抗等一系列代谢综合征相关特征(表 1)。

2.3 tau 蛋白与 Aβ 的表达

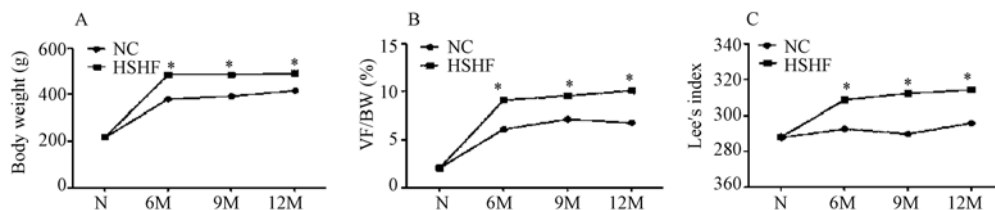
图 2 结果表明,模型组动物 P-tau(s199)在 6 月就明显升高,9 月达到最高值,且持续到 12 月仍较正常组明显升高;而 P-tau(s396)在 9 月明显升高且达到最高值,一直持续到 12 月。模型组动物 Aβ 的表达在 6,9,12 月均明显高于正常组,其差异具有显著性。

2.4 脑组织皮层病理学观察

图 3(见文后彩插 1)结果表明,正常组动物脑组织结构正常,模型组动物 6 月开始出现少量炎性细胞浸润,到 12 月时炎性细胞浸润最为严重。

3 讨论

AD 是一种中枢神经系统原发性退行性疾病,起病徐缓,病程呈进行性,病因迄今未明。由于人均寿命延长,老年人口迅速增长,AD 患病人数必然相应增加,已成为许多国家的主要保健和社会问题之一。Yaffe 等^[7]对 2 632 名患者追踪调查结果表明,MS 是认知功能下降的高危险因素。因此本实验在高糖高脂诱发代谢综合征模型基础上对动物脑组织进行了相关的研究,以求进一步发现 AD 与 MS 在早期的联系。我们的实验结果显示,模型组动物在出现代谢指标变化的同时会出现 AD 相关的特征性病理改变。且 HE 染色显示,模型组动物脑



注:NC:正常组动物;HSHF:高糖高脂组动物;VF:内脏脂肪重量;BW:体重。

图 1 体重、内脏脂肪、Lees 指数的变化

Note: NC: Normal control group; HSHF: Model groups established by high-sugar high-fat diet. VF: Visceral fat weight; BW: Body weight.

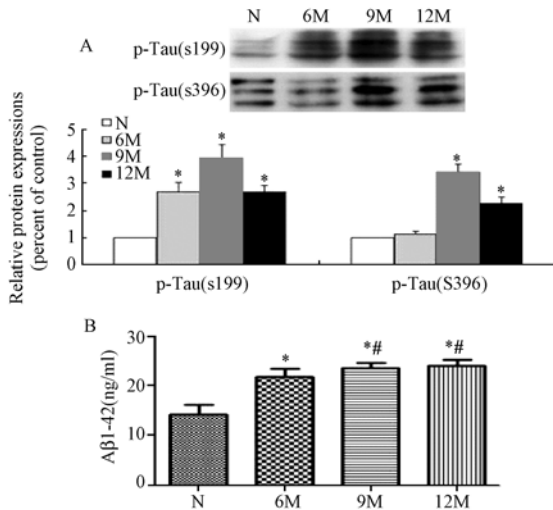
Fig.1 Changes of body weight, visceral fat, and Lee's index in the rats.

表 1 血液中代谢相关指标的变化

Tab.1 Changes of metabolic-related factors in the blood.

	甘油三酯 (TGmmol/L)	高密度脂蛋白 (HDLmmol/L)	低密度脂蛋白 (LDLmmol/L)	血糖 (FPGmmol/L)	胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR)
对照组 (Control)	0.080 ± 0.029	1.784 ± 0.1412	0.622 ± 0.113	5.099 ± 0.629	1.685 ± 0.177
6 月模型组 (6M)	0.556 ± 0.151 **	0.501 ± 0.112 **	2.878 ± 0.337 *	11.709 ± 0.471 *	3.604 ± 0.202 *
9 月模型组 (9M)	0.570 ± 0.176 **	0.477 ± 0.179 **	3.440 ± 0.127 **	13.784 ± 0.141 **	3.570 ± 0.184 **
12 月模型组 (12M)	0.562 ± 0.143 **	0.434 ± 0.125 **	3.447 ± 0.099 **	14.657 ± 0.171 **	3.390 ± 0.227 **

注:与对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ 。Note: compared with the control * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$.



注: N: 正常组动物; 6M: 6 月高糖高脂组; 9M: 9 月高糖高脂组; 12M: 12 月高糖高脂组; * $P < 0.05$ 与正常组比较; # $P < 0.05$ 与 6 月高糖高脂组比较。

图 2 脑组织 Tau 蛋白与 Aβ 含量

Note: N: Control group; 6M: High-sugar high-fat diet for 6 months; 9M: High-sugar high-fat diet for 9 months; 12M: High-sugar high-fat diet for 12 months. * $P < 0.05$, compared with the control group; # $P < 0.05$, compared with the 6M group.

Fig. 2 Expressions of Tau proteins and Aβ in the brain tissue

组织有大量炎性细胞的浸润,随着时间的推迟,炎性细胞浸润逐渐增多。目前认为,炎症是引起 Aβ 沉积的继发性反应,也是导致神经元退行性变的重要因素。外周炎症因子通过活化脑血管内皮细胞进入脑内,可引起中枢炎症反应,进而影响认知功能^[8],同时炎症因子激活脑内小胶质细胞,活化后的小胶质细胞又可分泌更多的炎症因子,从而形成恶性循环,使脑内炎症放大。McDonald 等^[9]研究表明 激活的小胶质细胞可产生大量的 APP,成为更多 Aβ 的来源。Tamagno 等^[10]的研究亦提示 Aβ 所致氧化应激生成的过氧化产物能够上调 β 分泌酶的表达,从而加快 APP 的异常剪切,产生更多的 Aβ。脑内炎症不仅促进脑内淀粉样蛋白 Aβ 的聚集,还可使 tau 蛋白的过度磷酸化,从而促进 AD 发生。

中枢性胰岛素抵抗也是大家公认 SAD 发病机制之一。胰岛素信号转导通路在中枢神经系统内广泛存在,其通路异常可影响脑内葡萄糖的代谢水平,而葡萄糖是脑内供应能量的主要物质。IR 的产生不仅会影响脑组织的能量利用,同时也扰乱了大脑神经中枢信号的传递,因而导致患者认知功能障碍的发生。多项研究表明,胰岛素抵抗与认知功能下降或 AD 的危险性具有明显的相关性^[11]。本

实验通过长期高糖高脂饲养动物,出现了一系列代谢综合征相关疾病的动物模型,其基本特征除炎症外均存在胰岛素抵抗。外周炎症可参与并促进 IR 的发生,我们推测中枢的炎症同样也可促进中枢 IR 的发生;而且高糖高脂喂养大鼠模型在早期就已出现了肥胖^[12],导致体重和内脏脂肪含量明显增加,脂肪细胞发生分化异常,引起游离脂肪酸(FFA)水平增加并导致异位沉积。FFA 增加与胰岛素抵抗的发生密切相关,可以影响胰岛素信号转导通路,抑制外周组织及中枢对葡萄糖的摄取,使葡萄糖氧化和非氧化利用发生障碍。因此,高脂饮食可通过影响胰岛素信号转导通路导致外周 IR,其胰岛素受体数目、PI-3K、PKB 及 GLUT4 水平在高脂饮食后均有所改变。脑内的 IR 不会因高浓度的胰岛素水平,而下调其在细胞膜上的表达,但与其与胰岛素的结合受饥饿、肥胖、老化和地塞米松治疗的影响。本实验后续结果显示,高糖高脂饮食同样可以通过影响胰岛素信号转导通路使中枢发生 IR, PI-3K, PKB, 及 GLUT3 水平均会发生改变。

综上所述,动物在高糖高脂饮食喂养下,除可发生代谢综合征相关疾病,还可导致 AD 样改变,可作为研究早期老年痴呆较为贴合人类实际的动物模型。

参考文献:

- [1] Rasgon N, Jarvik L. Insulin resistance, affective disorders, and Alzheimer's disease: review and hypothesis [J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2004, 59(2): 178-83; discussion 84-92.
- [2] 李焱. 中枢胰岛素抵抗与阿尔茨海默病发病关系的认识 [J]. 诊断学理论与实践, 2009, 8(3): 248-251.
- [3] Vanhanen, M, Koivisto, K, Moilanen, L, et al. Association of metabolic syndrome with Alzheimer disease: a population-based study [J]. Neurology, 2006, 67: 843-847.
- [4] 吴惠文, 韩德五, 许瑞龄, 等. 甘氨酸对高果糖饮食诱导的大鼠胰岛素抵抗认知功能损害的影响 [J]. Chin J Pathophysiol, 2012, 28(2): 302-307.
- [5] 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]. J Alzheimers Dis, 2005, 7: 63-80.
- [6] 周鑫, 韩德五, 李素红, 等. 高糖高脂致大鼠非酒精性脂肪肝病合并高血糖动物模型的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(7): 22-27.
- [7] Yaffe K, Blackwell T, Kanaya AM, et al. Diabetes, impaired fasting glucose, and development of cognitive impairment in older women [J]. Neurology, 2004, 63(4): 658-663.

(下转第 43 页)

- 大学, 2010, 19-31.
- [11] 温靖, 顾为望, 杨海英. SPF 级新西兰兔血液生理生化指标的测定 [J]. 动物医学进展, 2005, 26(1): 81-83.
- [12] 莫重辉, 常建军, 王生伟, 等. 西宁市某地绵羊胰脏功能研究初探 [J]. 动物医学进展, 2005, 26(1): 83-84.
- [13] 孙波, 刘文利. 右心导管法测定大鼠肺动脉高压的实验方法 [J]. 中国医学科学院学报, 1984, 6(6): 465-467.
- [14] 王新. 阿托伐他汀对兔肺动脉高压的作用及对白介素-6 水平的影响 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2009, 13-14.
- [15] 董浩然. 新西兰兔心衰气虚证模型的建立及其基因芯片数据分析 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2013. 17-27.
- [16] 李增强, 孙淑华, 孟金萍, 等. 无菌兔、SPF 兔和普通兔脏器系数的比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(1): 37-40.
- [17] 王刚, 张富发, 刘科, 等. 离乳一周 SPF 级与普通级新西兰兔血液学参数的比较 [J]. 实验动物科学, 2010, 27(2): 26-29.
- [18] 杨锋, 艾应先, 谢晓娟, 等. 屏障系统大耳白、新西兰兔血液学指标测定分析 [J]. 实验动物科学, 2012, 29(6): 26-29.

[修回日期]2015-06-28

(上接第 30 页)

- [8] Kongsman JP, Parnet P, Dantzer R. Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications [J]. Trends Neurosci. 2002, 25(3): 154-159.
- [9] McDonald DR, Brunden KR, and Landreth GE. Amyloid fibrils activate tyrosine kinase-dependent signaling and superoxide production in microglia [J]. J Neurosci, 1997. 17: 2284-2294.
- [10] Tamagno E, Parola M, Bardini P, et al. Beta-site APP cleaving enzyme up-regulation induced by 4-hydroxynonenal is mediated by stress-activated protein kinases pathways [J]. J Neurochem, 2005. 92(3): 628-636.
- [11] 石森. 2 型糖尿病与阿尔茨海默病相关性探讨 [J]. 继续医学教育, 2012, 26(11): 36-39.
- [12] 周鑫, 韩德五, 许瑞龄, 等. 肠源性内毒素血症在代谢综合征相关疾病发生发展中的作用及其机制 [J]. 中国病理生理学杂志, 2012, 28(3): 492-498.

[修回日期]2015-06-17

(上接 36 页)

- [3] Buyalos RP, Agaiwal SK. Endometriosis-associated infertility [J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2000, 12(5): 377-381.
- [4] Bamhart K, Dunsmoor-Su R, Coutifaris C. Effect of endometriosis on in vitro fertilization [J]. Fertil Steril, 2002, 77(6): 1148-1155.
- [5] 李靖, 李炫诚, 吴云霞. 确定小鼠动情周期的三种方法 [J]. 实验动物科学, 2007, 24(3): 63-64, 62.
- [6] 马丽, 谢淑武, 朱焰, 等. 注射法小鼠下下子宫内膜异位症模型及组织学观察 [J]. 中国实验动物学报, 2008, 16(3): 192-195.
- [7] 郭方, 徐丛剑. 腹腔注射甲氨蝶呤对小鼠异位内膜生长的影响 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2007, 23(9): 692-693.
- [8] 杨桂云, 刘红林. 补肾活血方对子宫内膜异位症不孕腹腔液微环境改善作用的实验研究 [J]. 中医药学刊, 2003, 21(1): 58-59.
- [9] 具春花, 陈玲. 补肾活血方对内异症伴不孕患者子宫内膜的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2008, 35(5): 722-723.
- [10] 王艳妮, 谈勇. 补肾活血法在子宫内膜异位症不孕患者行试管婴儿术中的应用体会 [J]. 实用中医药杂志, 2010, 26(4): 264.
- [11] 李新玲, 连方, 刘延荷. 祛瘀解毒颗粒治疗子宫内膜异位症患者卵泡液对小鼠胚胎发育的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2009, 29(11): 1001-1004.
- [12] Tabibzadeh S. Decoding implantation and menstruation: the tale of two opposing signals [J]. Front Bio Sci, 2002, 7: 475-486.
- [13] Wang H, Wen Y, Mooney S, et al. Matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase expression in human preimplantation embryos [J]. Fertil Steril, 2003, 80(Suppl 2): 736-742.

[修回日期]2015-06-13