|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 分类号： |  | 密级： |
| U D C ： |  | 编号： |

学位论文

阿卡波糖和 1-脱氧野尻霉素延缓小鼠脑衰老相关行为改变实验研究

Chronic Acarbose or DNJ Administration Alleviate the Age-related Behavioural Alteration in SAMP8 Mice: An Experimental Study

童晶晶

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 指导教师姓名 | 陈贵海教授安徽医科大学第一附属医院 | | |
| 申请学位级别 | 博士 | 专业名称 | 神经病学 |
| 提交论文日期 | 2015-03 | 论文答辩日期 | 2015-05-16 |
| 学位授予单位和日期 | 安徽医科大学 | |  |
|  |  | 答辩委员会主席 | 周江宁教授 |
|  |  | 评阅人 | 盲审 |

2015 年 5 月

**安徽医科大学**

**Anhui Medical University**

**博士学位论文**

论文题目 阿卡波糖和 1-脱氧野尻霉素延缓小鼠脑衰老相关行为改变实验研究

Chronic Acarbose or DNJ Administration Alleviate the Age-related Behavioural Alteration in SAMP8 Mice:

An Experimental Study

博士研究生童晶晶 指导教师陈贵海教授学科、专业神经病学

研究方向脑衰老及相关疾病

论文工作时间 2012 年 9 月至 2015 年 4 月基金项目国家自然科学基金

（编号：81370444，81301094）

2015 年 03 月

目 录

[中文摘要](#_Toc68630929) 7

[结 论](#_Toc68630930) 7

[Abstract](#_Toc68630931) 8

[1. 引言](#_Toc68630932) 9

[第一章 研究背景](#_Toc68630933) 9

[2. 胰岛素系统和糖代谢异常可能参与脑衰老](#_Toc68630934) 9

[3. 延缓衰老的方法](#_Toc68630935) 10

[4. 阿卡波糖和DNJ可能影响脑衰老](#_Toc68630936) 10

[5. SAMP8鼠模型在衰老研究中的地位](#_Toc68630937) 10

[6. 本论文的研究范围](#_Toc68630938) 11

[第二章 长期口服阿卡波糖和1-脱氧野尻霉素对P8鼠行](#_Toc68630939) 11

[1. 前言](#_Toc68630940) 11

[2. 材料与方法](#_Toc68630941) 11

[3. 结果](#_Toc68630942) 13

[4. 讨论](#_Toc68630943) 23

[5. 小结](#_Toc68630944) 24

[第三章 长期口服阿卡波糖和DNJ缓解P8鼠衰老相关行为学改变的机制探索](#_Toc68630945) 24

[1. 前言](#_Toc68630946) 24

[2. 材料与方法](#_Toc68630947) 25

[3. 结果](#_Toc68630948) 27

[4. 讨论](#_Toc68630949) 79

[5. 小结](#_Toc68630950) 81

[1. 研究结果和结论](#_Toc68630951) 82

[第四章 总结](#_Toc68630952) 82

[2. 研究的创新点](#_Toc68630953) 82

[3. 研究工作的不足和进一步设想](#_Toc68630954) 82

[参考文献](#_Toc68630955) 82

[附 录](#_Toc68630956) 89

[参考文献](#_Toc68630957) 92

综述 112

缩略语中英文对照表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **缩写** | **英文全称** | **中文全称** |
| AD | Alzheimer's disease | 阿尔茨海默病 |
| AOD | Average optical density | 平均光密度值 |
| Aβ | β-amyloid | β-淀粉样蛋白 |
| BDNF | Brain-derived neurotrophic factor | 脑源性神经生长因子 |
| CA | Cornu ammonis | 海马角 |
| DAB | diaminobenzidine | 二氨基联苯胺 |
| DG | Dentate gyrus | 齿状回 |
| DNJ | 1-deoxynojirimycin | 1-脱氧野尻霉素 |
| ELM | Episodic-like memory | 情景记忆 |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay | 酶联免疫吸附剂测定 |
| GFAP | Glial fibrillary acidic protein | 神经胶质纤维酸性蛋白 |
| H3K9 | Histone H4 lysine 8 | 组蛋白 H3 赖氨酸位点 9 |
| H4K8 | Histone H3 lysine 9 | 组蛋白 H4 赖氨酸位点 8 |
| HAT | Histone acetyltransferase | 组蛋白乙酰化 |
| HDAC | Histone deacetylase | 组蛋白去乙酰化酶 |
| InsRs | Insulin receptors | 胰岛素受体 |
| IGF-1 | Insulin-like growth factor 1 | 胰岛素生长因子-1 |
| IGF-1R | Insulin-like growth factor 1 receptor | 胰岛素生长因子-1 受体 |
| LTP | Long-term potentiation | 长时程激活 |
| MWM | Morris water maze | Morris 水迷宫 |
| MAPK | Mitogen-activated protein kinase | 丝裂原活化蛋白激酶 |
| NLR | Novel location recognition | 位置再认记忆 |
| NOR | Novel object recognition | 新物体再认记忆 |
| PI | Preferential index | 优先指数 |
| PIo | Preferential index for the old objects | 对旧物体的优先指数 |

1

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| PIod | Preferential index for the displaced old object | 位置移动的旧物体的优先  指数 |
| PI3K | phosphatidylinositol-3-kinase | 磷脂酰肌醇 3-激酶 |
| PD | Parkinson's disease | 帕金森病 |
| SABC | Strept avidin-biotin complex | 链霉亲和素-生物素复合物 |
| SAM | Senescence-accelerated mouse | 快速老化小鼠 |
| SAMP | Senescence-accelerated prone strains | 快速老化敏感小鼠 |
| SAMR | Senescence-accelerated resistant strains | 快速老化抵抗小鼠 |
| Syt 1 | Synaptotagmin 1 | 突触结合蛋白 1 |
| Stx 1 | Syntaxin 1 | 突触融合蛋白 1 |

2

# 中文摘要

背景

目前全球正在进入加速老龄化，脑衰老及衰老相关的认知能力下降严重损害了老年人生活质量。随着衰老进程，阿尔茨海默病和帕金森病等神经退行性疾病的发病率逐渐升高，而这些疾病尚无有效治疗手段。因此，延缓脑衰老的方法亟待探索。有研究提示在脑衰老过程中，胰岛素信号和糖代谢异常以及胰岛素样生长因子（IGF-1）和脑源性生长因子（BDNF）降低起重要作用。维持胰岛素/IGF-1信号和/或糖代谢的稳态可能延缓衰老相关的脑功能减退。热卡限制是目前得到广泛认可的抗衰老方式，但其抗衰老机制不明，可能涉及表观遗传学的改变和胰岛素信号的改善等变化。热卡限制的模拟药物或抗糖尿病药物具有应用于抗脑衰老领域的潜能。α-葡萄糖苷酶抑制剂阿卡波糖和1-脱氧野尻霉素（DNJ）能够降低餐后血糖水平，改善胰岛素敏感性，并且有保护心脑血管等功能，因此可能具有潜在的抗脑衰老作用。探讨阿卡波糖和DNJ对衰老的影响及相关机制，将加深对脑衰老机制的理解，并为如何积极有效防治脑衰老提供依据。

目的

探讨阿卡波糖和不同剂量DNJ对SAMP8小鼠衰老相关行为学及相关病理生理标志物的影响，并初步探索所涉及的表观遗传修饰机制。

方法

①2 月龄SAMP8 小鼠适应性喂养一月后随机分为老年对照组、阿卡波糖组

（20mg/kg/d）、高剂量DNJ组（20 mg/kg/d）和低剂量DNJ组（10 mg/kg/d），每组小鼠均为雌雄各8只，记录小鼠的体重动态变化情况。阿卡波糖组、DNJ组小鼠分别自3月龄至9月龄经饮水口服阿卡波糖和DNJ。另加入一组2月龄小鼠适应性喂养一月后作为青年对照组进入实验。②行为学检测主要包括：平衡能力

（平衡木和紧绳）；焦虑行为和自发探索活动（旷场）；学习记忆能力（Morris水迷宫，新物体再认，位置再认，情景样记忆任务）；最终完成行为学任务并进入后续实验的小鼠数量为老年对照组12只（6雄，6 雌），阿卡波糖组11只（5雄，

3

6雌），高剂量DNJ组13只（6雄，雌7）和低剂量DNJ组14只（7雄，7雌），青年对照组12只（6雄，6雌）。③完成行为学评估10天后麻醉小鼠，移除眼球取血，处死后分离海马，制作蜡块，采用酶联免疫吸附实验检测血糖和血胰岛素水平，采用免疫组织化学法检测小鼠海马齿状回、CA1和CA3亚区不同亚层胰岛素受体（InsR）、IGF-1受体和BDNF水平，突触活性带蛋白synaptotagmin1（Syt 1）和syntaxin1(Stx 1)含量以及星形胶质细胞活化增生状态改变情况；④采用免疫组织化学法检测各组小鼠海马组蛋白H4K8和H3K9乙酰化改变情况。

结果

①老年对照组小鼠感觉运动能力减退、旷场焦虑性降低；在MWM、位置再认、新物体再认和情景样记忆任务中表现了空间和非空间学习和记忆能力损害。长期服用阿卡波糖和DNJ不影响SAMP8小鼠生长发育，但能够缓解衰老相关运动能力和焦虑水平降低以及学习和记忆能力减退。20 mg/ kg∙d DNJ较10 mg/ kg∙d

DNJ效果好。②SAMP8鼠有衰老相关性血胰岛素和海马胰岛素受体、BDNF和Stx 1水平下降，海马IGF-1R、Syt 1、星形胶质细胞活化标志物GFAP水平升高，而血糖、血IGF-1和BDNF水平与青年鼠无明显差异。阿卡波糖和DNJ缓解了衰老相关的神经生化指标的改变，高剂量较低剂量DNJ效果更为显著。长期服用DNJ的小鼠血IGF-1和BDNF水平较老年对照高。这些衰老相关神经生化指标的改变与行为学有显著相关性。③阿卡波糖或DNJ 缓解了SAMP8 鼠衰老相关性海马

H4K8和H3K9乙酰化程度降低。

结 论

长期口服阿卡波糖或DNJ缓解了SAMP8小鼠衰老相关行为学和病理生理改变，表观遗传学修饰机制可能参与了该过程。

关键词：脑衰老/记忆/阿卡波糖/DNJ/胰岛素/表观遗传学

4

Abstract

**Background**

The world population is rapidly aging. Brain aging and age-related cognitive decline severely reduce the life quality of older people. The risk of Alzheimer's disease or Parkinson's disease rises sharply with age, and these neurodegenerative diseases have no effective treatment available. Therefore, approaches that alleviate brain aging are urgently needed. Studies have shown that the brain aging is associated with disturbance in insulin system and glucose homeostasis, and decrease of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the brain. Interventions that maintain the homeostasis of insulin/IGF-1 signaling and/or glucose metabolism may alleviate the deficits associated with the brain aging. A caloric restriction mimetic or a treatment for type 2 diabetes has the potential in the anti-brain aging. Acarbose and 1-Deoxynojirimycin (DNJ) are bothα-glucosidase inhibitors that can lead to a decrease of blood glucose level and increase of insulin sensitivity, and exert a protective role in the cardiovascular and cerebrovascular system, thus may have the potential against the brain aging. Exploring the effect of chronic acarbose and DNJ treatment on the brain aging would help us to understand the mechanisms of the brain aging and provides new insight on the anti-brain aging treatment.

**Objective**

The aim of this study is to explore the effect of chronic administration of acarbose and DNJ on the age-related behavioral and biochemical changes in the SAMP8 mice.

**Methods**

(1) The SAMP8 mice were randomly divided into old control group, acarbose group (20 mg/kg/d), higher-dose DNJ group (20 mg/kg/d) and lower-dose DNJ group (10 mg/kg/d). The body weight of each group was monitored monthly from 3- to

9- months of age. The mice in the acarbose or DNJ group were administered acarbose or

5

DNJ orally by drinking water from 3 to 9 months of age respectively. A new group of 2-month-old mice was added as young controls, after a 4-week acclimation period, undertook the same tests with the other groups. (2) The behavioral tests included: sensorimotor tasks (beam walking and tightrope), anxiety-based tasks (open field), learning and memory (Morris water maze, novel object recognition, novel location recognition and episodic-like memory). (3) After accomplished behavioral assessment, the mice were sacrificed, and the samples of blood and hippocampi were collected. The serum concentrations of glucose, insulin, BDNF and IGF-1 were tested by ELISA. The levels of insulin receptor (InsR), IGF-1 receptor (IGF-1R), BDNF, the presynaptic proteins synaptotagmin (Syt) 1 and syntaxin (Stx) 1, and the astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the different layers of hippocampus were detected by immunohistochemical staining. (3) The acetylation levels of histone H4 at lysine 8 (H4K8) and H3 at lysine 9 (H3K9) were detected by immunohistochemistry in the cell layer of dentate gyrus (DG), Cornu Ammonis (CA) subfield 1 (CA1) and CA subfield 3(CA3) of hippocampus CA3.

**Results**

(1) The old SAMP8 mice displayed an impairment of motor ability, open-field anxiety, spatial and non-spatial learning and memory abilities in the MWM, novel object recognition, novel location recognition and episodic-like memory tests. The age-related behavioral deficits were relieved by the acarbose or DNJ treatment. (2) The SAMP8 mice displayed age-related decreases in the serum insulin level and the levels of InsR, BDNF and Stx 1 in the hippocampus, and increases in the levels of IGF-1R, Syt 1 and astrocyte activation. The acarbose or DNJ treatment (especially at high dose) alleviated the biochemical indicators in the serum and hippocampus layers. Besides, the DNJ treatment elevated the BDNF and IGF-1 content in the serum. The changes of serological test and proteins content in the hippocampus layers were closely related to

The age-related behavior deficits. (3) The acarbose or DNJ treatment (especially at high

6

Dose) alleviated the decreases of H4K8 and H3K9 acetylation levels in the old hippocampus.

**Summary**

The chronic acarbose or DNJ treatment alleviated the age-related changes of behavioral and biochemical indicators, indicating their potentials against brain aging. Epigenetic modification mechanisms maybe involved in these changes.

**Key words**: Brain aging/ memory/Acarbose/DNJ/insulin/epigenetics

7

## 1. 引言

# 第一章 研究背景

衰老是生物体随时间推移自然老化的过程。人类在衰老过程中由于身体结构和机能的衰退，表现出活动受限、适应性、抵抗力减退、一系列身体或精神健康风险增加、失去独立生活能力等[1]。目前全球正在进入加速老龄化。据世界卫生组织统计资料显示，在2000年至2050年，全球60岁以上人口将从总人口数的11%增长至22%（即从6亿人口增长至20亿人口）；在此期间，80岁以上的人口数量将翻两番，在2050年将达到近4亿人。我国人口老龄化速度远快于欧美发达国家。导致老年人死亡的最常见疾病是心脏疾病，中风和慢性肺部疾病，而致残的最常见原因包括视力障碍、痴呆、听力下降和骨关节炎。许多老年人需要长期有效的卫生保健服务，而人口加速老龄化将严重增加社会负担。

脑衰老是指在衰老过程中，脑的结构、生化和功能的变化。老年人出现认知下降的几率高，80岁以上人群约40%有认知下降，严重影响的生活质量。认知能力下降是衰老和年龄相关神经退行性变的共同症状。包括感觉、知觉、记忆、思维等能力减退，其中记忆损害尤其是情景记忆和空间记忆损害最为突出[2]。临床研究中多任务测试提示人类在中年时开始出现认知功能降低[3]。脑衰老根据老年人是否存在与神经变性疾病如阿尔茨海默病（AD）和帕金森病（PD）分为正常脑衰老和病理性脑衰老。正常脑衰老根据认知功能是否下降分为成功衰老和非成功衰老[4]。

衰老是一些神经变性疾病，如AD和PD的独立危险因素。据世界卫生组织资料显示，目前AD约占导致老年人痴呆的疾病的60%，而且其发病率逐年升高，全球约有2600万人受累。如果没有有效的治疗和预防手段，预计在2050年全球将有1.06亿人罹患AD。然而目前，AD等神经变性疾病尚无特异有效的治疗方法。因此，研究脑衰老的机制，探索延缓脑衰老和减轻衰老相关病变的方法非常重要。尽管有许多关注神经退行性疾病的研究，但是关于正常脑衰老的研究相对较少。

目前，导致衰老及衰老相关性记忆下降的确切机制依然不明确。存在许多学说和假设，诸如端粒学说、自由基学说、线粒体DNA损伤学说、炎性衰老理论等

8

[5-7]。目前的证据表明，许多因素参与了脑衰老过程，包括基因、环境、营养状态、生活习惯等。慢性炎症状态、过度氧化应激、代谢异常均可加速脑衰老[1, 8]。根据这些机制来探寻延缓脑衰老的方法对促进成功衰老具有重要意义。

## 2. 胰岛素系统和糖代谢异常可能参与脑衰老

研究提示胰岛素在中枢神经系统中发挥重要的作用，包括调节糖代谢，参与调节认知功能[9, 10]。在大脑中，正常的胰岛素信号介导神经元和胶质细胞的生长，代谢功能和生存[10]。胰岛素受体（Insulin receptors, InsRs）广泛分布在脑组织内嗅球，大脑皮质和海马等记忆相关部位，调控神经递质释放和受体募集[11]。脑衰老伴有代谢异常，包括胰岛素水平异常和糖代谢紊乱。衰老脑的InsR和胰岛素生长因子（IGF-1）水平、脑源性神经生长因子（BDNF）均下降[12, 13]。脑胰岛素水平和C肽浓度呈正相关，两者均随年龄升高而降低[14]。越来越多的研究提示胰岛素和IGF-1参与调节神经元，胶质细胞的功能和存活，而且在调节突触传递和长时程增强（LTP）上具有重要作用。同时，胰岛素对β-淀粉样蛋白（Aβ）代谢有调节作用，能减少Aβ产生，减轻Aβ导致的LTP和突触损害[15, 16]。对于非糖尿病大鼠的研究发现在进行空间学习记忆任务后，其海马齿状回（DG）和海马角（CA1区）的InsR表达升高，提示胰岛素信号对突触可塑性有重要作用[17]。研究发现胰岛素抵抗与正常老年人和AD患者加速的衰老相关性认知缺陷有密切关系[18, 19]。胰岛素缺乏或抵抗可导致神经元能量缺陷，更易受氧化应激损伤、神经元凋亡和突触可塑性损害，从而最终导致脑衰老相关性损害[20]。经胰岛素治疗的糖尿病大鼠的海马突触可塑性得以恢复正常[21]。临床研究发现胰岛素经鼻腔给药能加强老年人的情景记忆和工作记忆[22]。

糖代谢异常，包括低糖血症和高糖血症，都可导致认知损害和其它脑功能损害[23, 24]。有研究发现老年人及老年大鼠海马糖利用率降低，补充葡萄糖可以有效提高AD患者或唐氏综合症患者以及正常成人的认知水平[23, 25]。高糖血症通过加重脑内微血管病变、氧化应激、促炎症因子水平和晚期糖基化终末产物损伤神经元，导致认知功能损害[26]。

9

## 3. 延缓衰老的方法

有研究提示胰岛素/IGF-1信号系统和糖代谢异常在脑衰老过程中起重要作用。维持胰岛素/IGF-1信号系统和/或糖代谢的稳态可能延缓或防止衰老相关的脑功能减退。可能通过调节代谢等机制延缓衰老的方式包括：热卡限制、体育锻炼、胰岛素使用等。

### 3.1. 热卡限制

热卡限制是目前唯一得到广泛认可的抗衰老效应方式，可延长啮齿类、灵长类动物以及人类的寿命[27]。研究发现热卡限制能够延缓衰老，降低心血管疾病、糖尿病的发病率，提高认知功能[27-30]。其延缓衰老的机制涉及多个方面，包括增加胰岛素敏感性、增加BDNF的产生、降低代谢率、抗氧化应激、抑制炎症反应、激活泛素蛋白酶体及促进自噬等[30, 31]。热卡限制能够改善糖耐量，提高胰岛素敏感性，该现象在啮齿类动物及人类实验中均有报道[32, 33]。此效应可能主要是通过降低机体氧化应激反应和调节长寿基因的表达来实现的[34, 35]。如果长期坚持热量限制，则能够达到提高健康水平，延缓衰老的效果。然而，人类很难长期坚持热量限制这种干预方案，可能是由于行为、生理、心理和环境变量之间复杂的相互作用。因此就需要寻求热卡限制的模拟药物。

### 3.2. 体育锻炼

体育锻炼，特别是有氧锻炼，能够减轻正常成人认知损害，降低痴呆发生率。进行有氧锻炼的健康成人的海马体积较大，衰老相关性灰质体积减小程度较轻[36,

37]，胰岛素敏感性和认知测试成绩也显著高于对照组[38]。对于已患有轻度认知损

害或痴呆的病人，长期锻炼也能够提高认知评分[39]。对于2型糖尿病患者，体育

锻炼能改善其糖耐量，降低体脂[40]。有研究发现老年女性在连续9个月的锻炼结

束3天后，检测结果显示糖利用率和胰岛素敏感性升高[41]。在小鼠实验中，也有长期运动提高外周胰岛素敏感性的报道[42]。越来越多的研究发现运动能够通过升高外周IGF-1和BDNF水平、促进神经发生、改善突触可塑性，进而提高海马功能[43]。此外，动物及人类研究均发现体育锻炼能够通过减少氧化应激损伤缓解衰

10

老或AD相关的海马神经退行性过程[44]。

### 3.3. 胰岛素使用

实验发现外周给予胰岛素能够激活包括海马在内的颞叶，从而提高人类单词回忆任务的成绩[45]。然而，静脉应用胰岛素有较强的外周副作用，特别是低糖血症，这条给药途径难以用于进行胰岛素对记忆的作用研究。经鼻给药能够减少外周不良反应，选择性升高脑胰岛素水平[46]。在大鼠实验中，脑室内注射胰岛素能够提高海马神经元胞膜上InsR表达，改善被动回避任务中的认知能力[47]。临床研究发现经鼻应用胰岛素改善AD或轻度认知减退的患者的记忆能力和脑代谢[48, 49]。在AD等神经变性疾病的早期伴随着脑内能量代谢、细胞和生存修复、神经可塑性等功能状态的逐渐下降，经鼻腔应用胰岛素能够直接高效地进入脑内，发挥支持神经功能的作用[50]。健康成人连续八周经鼻应用胰岛素后，在延迟单词回忆任务中的陈述性记忆能力显著提高[51]。有研究发现即便是单次大剂量经鼻给药也能够有效提高空间及工作记忆任务中的成绩[22, 52]。然而，经鼻给胰岛素也可能导致低糖血症，血压升高等副作用[53]。局部高水平胰岛素可能损伤脑组织。此外，鉴于胰岛素具有促进细胞生长的功能，长期应用可能会促进肿瘤细胞增殖[54]。因此，如何提高经鼻胰岛素治疗的安全性，有效性和特异性尚需研究。

### 3.4. IGF-1

IGF-1和IGF-1受体在大脑内广泛分布。IGF-1和胰岛素激活相似的信号通路，介导神经元生长、再生和修复[55]。老年小鼠中枢和外周血中IGF-I水平降低，脑内IGF-I信号降低，可能参与了衰老相关的认知损害[13]。然而，有研究发现IGF-1参与控制哺乳动物衰老。GH缺乏和抵抗的小鼠都有IGF-1肝表达量减少，外周IGF-1水平降低，但是它们的寿命是延长的[56]。特异性敲除IGF-1受体也能够延长小鼠寿命[57]。尽管如此，IGF-1对认知功能的保护作用还是获得了很多文献支持

[58]. 例如，侧脑室植入微型渗透泵注入IGF-1（23.5μg/泵）提高了大鼠重复采集任务和新物体再认任务中的工作记忆[59]。在加速衰老的Zmpste24缺陷小鼠，IGF-1 能显著延缓其衰老过程[60]。研究报道一些AD病人伴有IGF-1抵抗和/或IGF-1缺乏

[61]. 动物实验也发现外周缓慢释放IGF-1提高了AD小鼠模型的认知能力，缓解

11

脑内Aβ沉积、胶质增生等病理改变[62]。此外，IGF-1能够改善糖尿病大鼠的认知障碍和脑萎缩，可能是通过改善了胰岛素敏感性[63]。因此，IGF-1在脑衰老中的作用复杂，还有待进一步研究。

### 3.5. 降糖药

二甲双胍是一种常用降糖药和热卡限制模拟物，通过延缓葡萄糖由胃肠道的摄取、提高胰岛素的敏感性、增加外周葡萄糖的利用发挥治疗糖尿病的作用。能够促进糖异生，增加胰岛素敏感性，减轻高脂饮食大鼠的学习能力下降[64]。长期服用二甲双胍的糖尿病病人的认知损害风险降低[65]。然而也有临床研究报道了二甲双胍加重老年糖尿病病人的认知减退，可能是通过诱导了维生素B12缺乏。补充维生素B12和钙剂能缓解二甲双胍诱导的维生素B12缺乏，提高认知能力[66]。二甲双胍的常见副作用主要是胃肠道症状，包括腹泻、恶心、呕吐、肠胀气等[67]。研究发现AD患者单独应用二甲双胍可能促进Aβ产生，加重AD神经退行性变，而联合使用胰岛素和二甲双胍对于早期AD的老年病人是有益的，提高了这些患者的认知功能，缓解了神经变性损害[68]。此外，二甲双胍具有抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合体1（mTORC1）的功能，能够延长小鼠寿命[69]。与二甲双胍降糖机制类似的苯乙双胍也具有促进胰岛素信号和延长寿命的作用[70]。

### 3.6. 噻唑烷二酮类抗糖尿病药

噻唑烷二酮类抗糖尿病药罗格列酮、吡格列酮可通过提高胰岛素的敏感性而有效地控制血糖。该类药物激活过氧化物酶体增殖激活受体γ(PPAR-γ)，参与糖脂代谢，调控胰岛素反应基因的转录。短期吡格列酮治疗能够减少转基因AD模型鼠的Aβ聚集和神经炎症反应[71]。罗格列酮和吡格列酮均可缓解AD模型鼠的疾病进展，提高认知功能[72, 73]。另外，对于正常Wistar大鼠的衰老相关认知损害，罗格列酮也可发挥缓解作用[74]。在临床实验中，老年患者服用罗格列酮减轻了认知功能损害[75]。然而，该类药物具有心血管系统副作用，会增加急性心梗的风险，所以在糖尿病治疗及痴呆预防上的应用大受限制[76]。

### 3.7. 肠降血糖素

胰高血糖素样肽-1和抑胃肽能够以葡萄糖依赖的方式诱导胰腺β细胞分泌胰

12

岛素，因此可被视为胰岛素促分泌剂。这两种肽的受体在大脑也有分布[77]。胰高血糖素样肽-1的更稳定形式的模拟药物（艾塞那肽和利拉鲁肽）目前被用于糖尿病辅助治疗。有研究发现艾塞那肽和利拉鲁肽缓解AD模型鼠的症状和神经变性. 减轻Aβ寡聚体对中枢胰岛素信号的毒性作用，缓解突触可塑性及空间学习记忆能力的损害[78, 79]。目前尚无肠降血糖素模拟药物对正常脑衰老的作用的研究。

## 4. 阿卡波糖和DNJ可能影响脑衰老

上文中许多研究提示了维持胰岛素系统和糖代谢稳态的热卡限制模拟物或治疗糖尿病的药物可能延缓衰老。阿卡波糖是一种α-葡萄糖苷酶抑制剂，广泛用于糖尿病和糖尿病前期治疗[80]。阿卡波糖通过竞争性地抑制α-葡萄糖苷酶，减慢肠道内的淀粉分解成葡萄糖的速度，降低餐后血糖水平和改善胰岛素敏感性。因此也可被视为热卡限制模拟物[81, 82]。相比其它抗糖尿病药物，阿卡波糖具有如下优点，包括减少低血糖的发生率，降低血清总胆固醇、低密度脂蛋白、胆固醇和甘油三酯，稳定颈动脉斑块，保护心脑血管[80, 83]。研究发现阿卡波糖能够预防糖尿病、高血压及心血管疾病[84]。因此，阿卡波糖可能具有潜在的抗脑衰老作用。目前尚无研究评估阿卡波糖是否影响小鼠脑功能状态及脑生理病理改变。

另一种降糖物质1-脱氧野尻霉素（1-deoxynojirimycin, DNJ）也是小肠α-葡萄糖苷酶强效竞争性抑制剂[85]。DNJ的化学名为3, 4, 5-三羟基-2-羟甲基四氢吡啶，是桑叶中主要生物碱成分，也存在于其他植物和微生物中。传统用于治疗2型糖尿病的α-葡萄糖苷酶抑制剂，例如阿卡波糖，米格列醇和伏格列波糖，都有胃肠道副作用（胀气和腹泻），偶有肝毒性[86]，而DNJ安全性相对较好[87]。DNJ经口服给药后，以整体的形式迅速被消化道吸收的，以剂量依赖方式进入血浆，在30min后大鼠血浆中DNJ浓度达到高峰。然后，很快被排出体外，血浆检测不到任何DNJ的代谢产物[88]。

DNJ竞争性抑制小肠α-葡萄糖苷酶，抑制餐后血糖升高和增加胰岛素敏感性

[87]. 除了调节糖和胰岛素代谢, DNJ还有抗肥胖和抗氧化功能。高脂血症病人在服用12周富含DNJ的桑叶提取物后，血甘油三酯和极低密度脂蛋白水平降低，高密

13

度脂蛋白水平升高[89]。啮齿类动物实验也发现摄取DNJ降低了C57BL/6 J小鼠肝脏和血中脂肪聚积量，而且减少了氧化应激损伤[90]。此外，DNJ对一些病原体的抑制作用也有报道。如DNJ具有抗黏附活性，抑制变形链球菌过度生长，因此可能用于治疗变形链球菌感染[91]。DNJ及其衍生物对牛病毒性腹泻病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒有抗病毒作用[92]。DNJ能够显著抑制逆转录酶病毒活性，如人获得性免疫缺陷病毒(HIV) [93]。由于HIV是借助包膜糖蛋白(gp120)附着于辅助型T细胞的CD4细胞受体上，α-葡萄糖苷酶参与gp120蛋白的加工和折叠，因此

DNJ通过抑制该酶的活性，削弱了HIV对T细胞的侵袭能力[93]。此外，DNJ还具有抑制B16F10黑色细胞肿瘤转移的作用[94]。基于上述对DNJ功能的研究，我们认为DNJ可能具有抗衰老的潜质，其是否能够影响脑衰老过程值得进行实验探索。

## 5. SAMP8鼠模型在衰老研究中的地位

在衰老研究中，由于直接研究人类有诸多限制，合理选取或建立啮齿类动物模型至关重要。快速老化小鼠SAM (senescence accelerated mouse)株是日本京都大学Takeda教授由AKR/J株小鼠培育而得的一种近交系衰老模型鼠，随后发展为两个品系，快速老化敏感小鼠SAMP (senescence accelerated-prone mouse)和快速老化抵抗小鼠SAMR (senescence accelerated-resistant mouse) [95]. SAMP小鼠通常在正常发育成熟期后快速出现皮肤粗糙、脱毛、眼周皮损和脊柱脱位增加，寿命缩短（平均寿命约为12月）。

SAMP8是SAMP系中的一个亚系，既有自然衰老小鼠的特征，又有AD样病理表现。在行为学上，SAMP8小鼠有正常的生长发育和神经系统成熟期（4−6月龄），到中年时期提前出现加速衰老的表现，包括衰老相关的行为迟缓、学习记忆功能衰退以及焦虑性改变[96, 97]。SAMP8小鼠随月龄增长学习记忆能力逐渐减退，一般认为，SAMP8小鼠在8月龄时已出现明显的学习记忆障碍[98]。本实验室团队既往研究用六臂辐射状水迷宫检测发现SAMP8小鼠早在3月龄和5月龄即可分别显示空间学习和空间记忆能力的下降[96]。在形态学上，老年SAMP8小鼠海马锥体细胞的树突密度减少，皮质神经细胞缺失，以脑干为中心出现海绵状变化，并伴

14

有血脑屏障障碍[99]。同时，SAMP8鼠的海马少突胶质细胞呈年龄相关性退化[100]，而皮质和海马部位的星性胶质细胞呈年龄相关性增加[101]。研究发现老年SAMP8鼠还存在脑衰老相关脑内生化改变和病理变化，如皮质细胞凋亡蛋白酶和钙蛋白酶活性增加，淀粉样前体蛋白（APP）表达升高、淀粉样Aβ肽水平升高和过度磷酸化的tau蛋白水平增加[102]。由于SAMP鼠能较早地表现出与人类正常衰老相似的生理、病理特征，因此它是目前公认的研究脑衰老及其相关疾病的发生机制、评价抗脑衰老药物疗效及其作用机制的优选动物模型[103]。

## 6. 本论文的研究范围

随着全球人口的老龄化，衰老已成为国内外研究的焦点。其中，脑衰老主要表现年龄相关认知功能减退，导致老年人生活质量降低，卫生保健压力显著增加，其相关机制的研究越来越受到关注。目前，脑衰老的机制尚不明确。有研究提示胰岛素信号及糖代谢异常可能参与了脑衰老的过程，而热卡限制模拟药物及治疗

糖尿病的药物可能缓解脑衰老。

zkq 20160118

本研究使用快速老化动物模型SAMP8小鼠，用于研究阿卡波糖和DNJ是否可以缓解小鼠的脑衰老过程，并初步探索该过程是否涉及表观遗传学改变。为此，我们设计了一系列实验以期达到上述实验目的：

①评估长期服用阿卡波糖和DNJ是否影响衰老相关行为学改变；

②长期服用阿卡波糖和DNJ是否影响胰岛素系统指标（包括血糖、血胰岛素，海马InsR）水平和海马IGF-1受体（IGF-1R）、BDNF、突触活性带蛋白synaptotagmin 1（Syt 1）和syntaxin 1（Stx 1）水平以及星形胶质细胞活化增生等改变情况；

③长期服用阿卡波糖和DNJ是否影响表观遗传学修饰改变（海马组蛋白H4K8

和H3K9乙酰化水平）。

# 第二章 长期口服阿卡波糖和1-脱氧野尻霉素对P8鼠行

15

为学的影响

## 1. 前言

随着全球老龄人口迅速增加，[衰老](http://www.bioon.com/biology/Special/aging/Index.shtml)与衰老相关神经变性疾病（如阿尔茨海默病、帕金森病）已成为研究热点。然而目前并没有能有效治疗这些疾病的药物，缓解或阻止衰老发生发展的抗衰老药物亟待开发，以降低老年病的发病率。随着年龄增长，人类的一个重要症状是认知功能减退[104]，尤以空间和情景记忆损害为重。同样，在动物研究中，衰老伴随着行为学退化性改变，包括感觉运动能力、探索行为减少、情感异常、以及显著的认知能力减退[104-106]。通过研究动物的衰老相关性的行为学特点能够早期直观地考察干预措施对衰老的影响。

在衰老的过程中，人类和一些动物模型存在胰岛素缺乏或抵抗，脑内胰岛素受体减少，胰岛素信号减弱，糖利用率降低[12]。中枢神经系统内的胰岛素信号对神经元的代谢、突起生长、再生和突触可塑性发挥重要作用[20]。衰老过程中脑内胰岛素信号的异常变化可能是z引kq起认2知01减60退11的8原因之一[12]。研究发现一些维持胰

岛素系统和/或糖代谢稳态的干预措施能够缓解衰老相关脑功能损害。例如，热卡

限制和体育锻炼具有抗衰老效应，能提高胰岛素敏感性、升高脑BDNF水平、减轻氧化应激反应，从而缓解衰老相关认知功能减退[37, 107, 108]。然而对于人类个体，尤其是中老年人，长期坚持这种生活方式上的干预难度较大[31]。此外，热卡限制还可能有随之而来的营养不良、营养素缺乏、创伤愈合慢等副作用。因此，热卡限制的实施方式和限定程度尚需研究。有研究发现治疗糖尿病的药物二甲双胍能缓解肥胖大鼠的认知能力减退的作用[64]，但在应用于人类时效果不确定[66]。罗格列酮也能减轻衰老相关认知功能减退，但其对心血管系统副作用限制了其临床应用[75, 76]。尽管探索抗衰老干预的研究道路中有许多阻碍，研究者们的发现有力地支持了热卡限制模拟物或抗糖尿病药物可能具有延缓或防止衰老的功能。

常用于治疗糖尿病的阿卡波糖，通过竞争性抑制小肠内α-葡萄糖苷酶，减少葡萄糖吸收，达到降低血糖，增加胰岛素敏感性的效果[80, 82]。此外，阿卡波糖还能降血脂、稳定颈动脉斑块，从而降低心脑血管疾病发生率[80, 83]。因此，阿卡波糖

16

是可能用于延缓衰老的候选药物。最近，有研究报道阿卡波糖能够延长小鼠寿命

[109]，但并未考察阿卡波糖是否影响小鼠脑功能、认知能力以及脑生理病理改变。

DNJ的降糖机制与阿卡波糖相同，也是一种α-葡萄糖苷酶抑制剂，可用于治疗糖尿病及其并发症[85]。此外，DNJ尚具有其它功效，包括降低血脂、提高胰岛素敏感性、抑制细菌病毒、抑制肿瘤转移等，因而具有广泛的利用前景[87, 89, 91, 93]。上述研究提示DNJ可能具有抗衰老的功效，但目前尚未见该方面的研究报道。

综上所述，本研究拟采用一系列行为学任务来研究长期口服阿卡波糖或DNJ对SAMP8小鼠体重及年龄相关性行为改变的影响，从而探索阿卡波糖或DNJ是否具有抗衰老作用。

## 2. 材料与方法

### 2.1 试剂

阿卡波糖是进口德国拜耳公司药品―拜唐苹‖片剂。DNJ 由合肥工业大学制备。

DNJ提取自一个DNJ高产菌株zk—q—2淡0紫16链01霉1菌8

TB-412菌株的发酵产物，然后经

大孔树脂和阳离子交换树脂，硅树脂等方法进行纯化[110]。最终DNJ 的纯度达到

23.60％，符合食品添加剂的要求。

### 2.2 动物及相应处理

SAMP8小鼠（2月龄）购于维通利华实验动物中心（北京）。对饲养环境进行条件控制，保持温度21～23℃，湿度50％～60％，明暗周期为12h（08:00开灯），食物和水充足。动物被随机分到老年对照组、阿卡波糖组和20 mg/kg/d DNJ组和10 mg/kg/d DNJ组（每组雌鼠雄鼠各8只）。阿卡波糖组小鼠自3月龄时开始随水摄入阿卡波糖（20 mg/kg/d, 溶于水）。DNJ组小鼠自3月龄时开始随水给予DNJ（分为20

mg/kg/d和10 mg/kg/d两个剂量）。为了维持剂量恒定，动态监测小鼠饮水量以调整配液浓度。记录小鼠每月体重值变化。至9月龄时开始行为学任务检测。在行为学实验开始前对小鼠进行预选，有运动障碍、脱毛、体表可见明显肿块的小鼠被排除。另外加入一组3月龄小鼠作为青年对照，共12只（6雄，6雌）。最终完成行为学任务并进入后续实验的小鼠数量为老年对照组12只（6雄，6雌），阿卡波糖组11只（5

17

雄，6雌），20 mg/ kg∙d DNJ组13只（6雄，雌7）和10 mg/ kg∙d DNJ组14只（7雄，7

雌），青年对照组12只（6雄，6雌）。

### 2.3 行为学程序

行为学检测包括感觉平衡运动能力（平衡木和紧绳任务）、焦虑行为（旷场实验）、学习记忆能力检测（Morris水迷宫MWM、位置再认、新物体再认、情景记忆）。在所有的实验前一周开始每天至少接触小鼠一次（拎尾、抚摸），每次至少2

min。实验开始前1小时将动物带进实验场地。实验安排在上午8−11点，下午2−5点，保持实验房间安静。

#### 2.3.1. 感觉平衡运动能力

#### 2.3.1.1.平衡木一根漆灰的钢质圆杆（长110 cm，直径10 mm）固定于两端直径20 cm的黑色圆形铁皮平台上，平台下有立柱支撑（高30 cm、直径20 cm）。整个装置放在直径150 cm的水池上，池中清水深5 cm，水温21-23℃。将单只动物放于钢杆中央，测试时间为60 s，记录动物在杆上平衡的时间（从抓杆至落下的时间）。如

果动物在一次测试期间仍在杆上或逃至2个平台之一，则记录的时间为60 s。每只

zkq 20160118

小鼠测试3次，记录每只动物每次测试的平衡时间，计算出均值。

#### 2.3.1.2.紧绳一根棉绳（长150cm, 直径2mm）绷紧于一直径150cm圆形水池上，池内注入21-23℃清水至10cm深，绳子与水面的高度为20 cm。实验开始前，提尾将小鼠放入水中适应5秒，随后进行实验，提尾使小鼠高于绳子，然后缓慢降低至其用双前爪抓住绳子的中央，小鼠的身体渐渐低于绳子后放开。记录小鼠掉入水中前的悬挂时间（最大60秒）。绳子每隔5cm有一黑墨标记以测定小鼠悬挂时的水平位移（前爪触到一个标记记为一个跨越）。如果小鼠掉入水中，则立即将其移入无垫料的塑料笼中并休息30秒再进行下次实验。如果小鼠在60秒内位移到紧绳任一端则放入笼内休息，记录为悬挂时间60秒、跨越数为15。未落水的小鼠在两次实验间期也放入笼内休息。每只小鼠进行3次测试，计算出每只小鼠的平均悬挂时间和跨越数。转换分=(平均悬挂时间+10×平均跨越数)。

2.3.2. 焦虑行为

18

旷场实验实验装置是一上方开口的黑木盒（内部场地大小为81×81 cm2）。盒

高28 cm，盒底漆纵横各3条白线（宽3 mm），形成16个等大的方格（每格20

×20 cm2）。场地的中央置一彩色塑料物体以激发小鼠的好奇心。照明来自场地中央上方2.80 m处的40-W白炽灯。每只小鼠接受一次测试。将小鼠面朝墙放入一个拐角方格，让其自由探索环境5 min。记录小鼠潜伏期（即走出第一格所经历的

时间）、跨越过的线条总数和周边时间（处在周边12个方格的总时间）。每次测试结束后，清水清洗场地并擦干。

#### 2.3.3. 学习记忆能力检测

#### 2.3.3.1. MWM一个黑色圆形塑料池（直径150cm，高30cm），充入自来水，水温21-23℃

[111]. 一个黑色圆形平台（直径10cm，高24cm）固定于迷宫其中一个象限的中央。

迷宫的四周垂一白布帘，等距离悬挂三个不同形状的黑色纸板（方形、三角形、圆形）作为迷宫外线索。装置中心上方天花板悬挂摄像机（SONY SSC-DC488P）用于记录迷宫内小鼠运动，摄z像kq机由2电01脑60控1制18，所录视频由Videotrack软件分析。

定位航行试验（place-learning phase）：平台低于水面1cm。每只小鼠每天进行

4次训练。每次试验的流程是：使小鼠面对游泳池一个象限（放平台的池除外）的

外沿，释其入水，在60秒内让动物逃上平台并在上至少待15秒后即终止试验。如果小鼠在60秒内未发现平台，则由实验者放上平台，15秒后再放回笼中。每次训练间歇为15分钟。笼子放于一炽热灯之下以减少核心温度的丧失。每次训练的释放点均不同，且每天释放点的顺序也不同。训练进行十天。

空间探索（probe phase）：在学习阶段的最后一天，进行一次探索试验来代替该天的第四次试验。撤走平台，原先放置平台的象限被称为目标象限，把小鼠从目标象限相对的那个象限释放入水，让小鼠在池内游泳60秒。计算出小鼠在目的象限内游泳距离、时间占总游泳距离、时间的百分比。

#### 2.3.3.2. 新物体再认该实验的装置是Y-型装置，由3个臂组成，每两个臂之间为120

度[111]，见图2-1 A。其中两个臂完全相同均为―物体‖臂，23cm长10cm宽，第三个

19

臂为起始臂，30cm长10cm宽，距离中心10cm处有一个提拉门，在探索时该门关闭。装置高40cm，小鼠在里面既看不到外面也不能跳上墙爬出去。整个实验装置被黑色布帘子围住，帘子距装置外侧约40cm。装置正上方40cm处有一个黑色的棚，顶棚中央悬挂一荧光灯，提供约50lm的均匀光线。一个连接电脑的摄像头掩藏在顶棚内以记录装置内的老鼠活动。实验开始前三天的适应期，小鼠每天被放入空装置内中自由探索五分钟。在采样期，Y型装置两物体臂分别放入两个相同物体(*a1*和*a2*)，在起始臂提拉门外放入小鼠，打开提拉门，小鼠进入物体后关闭提拉门，计时五分钟试验时间，试验结束后，小鼠被放回饲养笼。10分钟后进行第一次选择期（10-min延迟相），*a1*替换为新物体*b*，*a2*替换为与老物体相同的物体*a3*，小鼠可进行5分钟自由探索。采样期结束24小时后进入第二次选择期（24-h延迟相），物体*b*替换为老物体*a4*，*a3*替换为新物体*c*，试验时间为5分钟。小鼠触须，嘴或前爪接触物体视为对物体的一次探索。每次试验结束后用清水冲洗装置并擦干。视频分析由对实验设计不知情的实验员进行。用XNote Stopwatch 1.39软件记录试验视

频中小鼠每次试验第一分钟内zk探q索物20体16的0总11时8间（Tt），探索位于新物体的时间

（Tn）。用公式Tn / Tt×100%计算小鼠对位于新物体的优先指数（preferential index, PI）。

#### 2.3.3.3. 位置再认该实验的原理是基于具有相当完整的空间记忆能力的小鼠能够表现出对新位置上的物体的探索偏爱[112]。实验开始前三天，小鼠放入空装置（无物体）中进行适应性探索，每天一次，一次五分钟。第四天，正式实验前，单只小鼠放入空装置中探索一分钟。在正式实验的样品期，在装置远端两拐角（西北，NW；东北，NE）各放入两个相同物体（A1和A2），放入单只小鼠进行探索5分钟，见图2-1 B。10分钟后，在10-min延迟相，物体A2被从NE移动至东南拐角NS，小鼠被放入装置中自由探索5分钟。24小时后，在24-h延迟相, 物体A2被移动至南墙中部，放入小鼠自由探索5分钟。小鼠触须，嘴或前爪接触物体视为对物体的一次探索。记录每次试验中，第一分钟内小鼠探索物体的总时间（Tt），探索位于新位置的物体的时间（Tn），用于分析。小鼠对位于新位置的物体的优先指数PI计算公

20

式同物体再认。

#### 2.3.3.4. 情景记忆

实验装置是一个上方开口的金属方盒(30 cm×30 cm×40 cm)，四壁和底黑色，装置周围有一白色布帘围绕[113]。装置东西墙30 cm高的位置各钻一个直径0.5 cm

的孔，用作视觉线索。连续7天，每天将小鼠放入空装置中央令其自由探索1 分

钟。在第8−10天，小鼠每天被放入空装置中自由探索5分钟以进一步熟悉装置。在接下来的两天，盒子两远端（NW和NE）分别放置相同的物体A1和A2，小鼠每天进入装置探索10分钟，一共三次，每次间隔30分钟。第13天，每只小鼠进行两次采样期和一次试验期。在采样期1，装置内4个相同的物体B分别放置于北墙中央(NC)，南墙中央(SC)，西南角(SW)，东南角(SE)，小鼠探索10-min(见图2-1 C)。50分钟后进行采样期2，移出四个物体B，放入4个相同的新物体C分别置于方盒四角，放入小鼠探索10-min。50分钟后进行试验期，采样期1中的两个物体B（“旧的熟悉的”物体）分别置于NE和SW角，其中位于NE角的旧物体是位置移动的旧物体，采样期2的两个物体C（“新的熟悉的”物体）分别置于NW和SE角，放入小鼠探索10-min。每只小鼠探索后，用水彻底清洗并擦干实验装置及物体。小鼠触须，嘴或前爪接触物体视为对物体的一次探索。用XNote Stopwatch

1.39软件对试验视频中小鼠探索每个物体的时间进行分析记录。对旧的熟悉物体的优先指数(PI for the old objects, PIo)即为探索旧的熟悉物体的时间(To) /探索四个物体的总时间(Tt)。对位置移动的旧物体的优先指数(PI for the displaced old object, PIod)即为探索位置移动的旧物体的时间/ To。

21

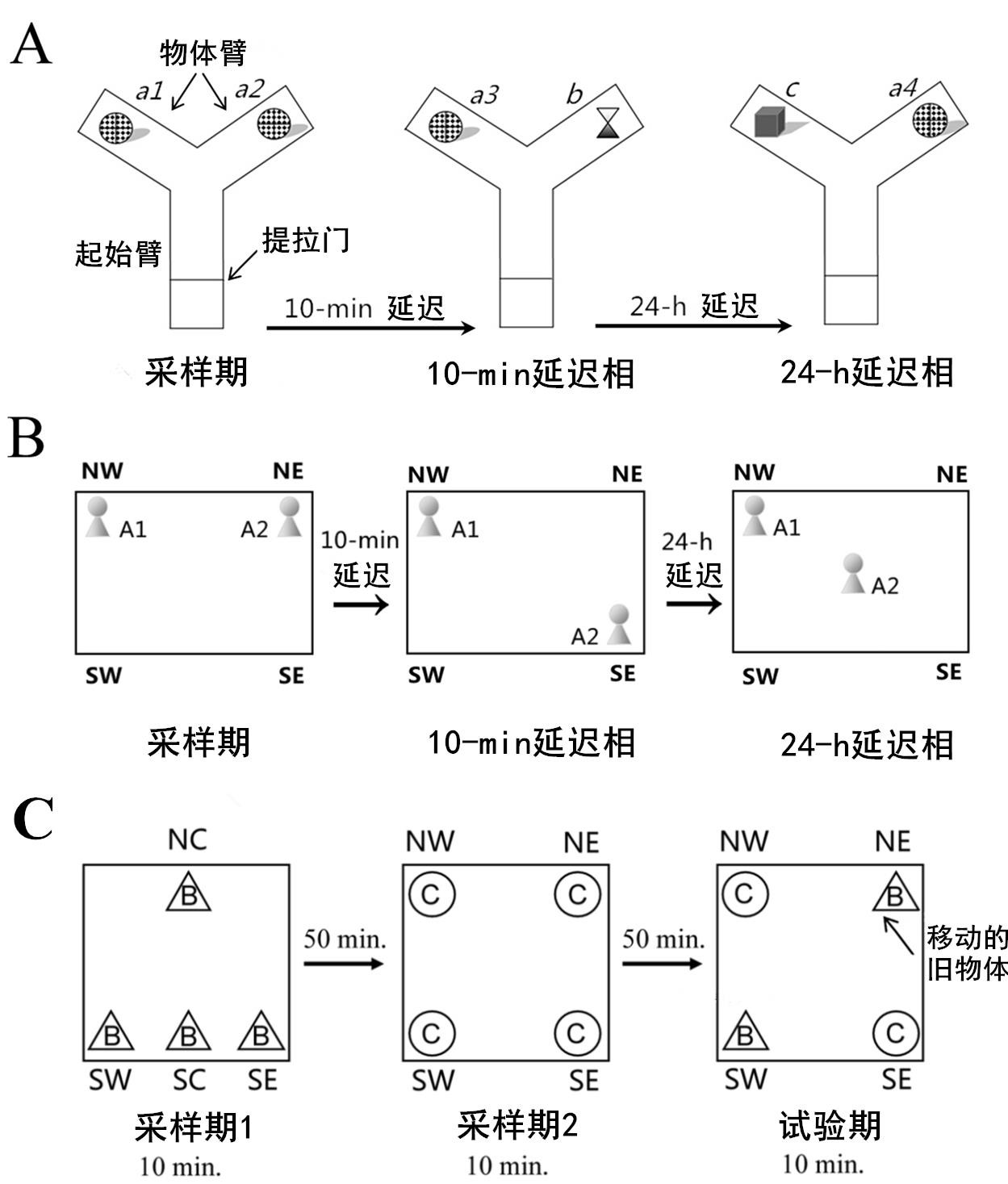


图2-1 新物体再认、位置再认和情景记忆试验的流程

Fig. 2-1 Schematic drawing of the protocol in the novel object recognition (A), novel location recognition (B) and episodic-like memory tasks (C)

### 2.4 统计分析

22

分析资料分布情况。如果资料呈正态分布，结果用均数±标准误表示。小鼠每天体重变化情况、MWM定位航行期成绩采用重复测定方差分析rm-ANOVA进行统计分析。其它任务成绩采用两因素方差分析ANOVA进行统计学分析，以组别和性别作为独立变量，以Dunnett 检验方法分析各组与老年对照组的差异，以

Bonferroni检验方法分析两个不同剂量DNJ组之间有无差异。在物体再认、位置再认和情景记忆任务中，除了分析年龄和处理效应，还进行单样本t检验分析每组

PI值与50 %是否存在差异。如果资料呈非正态分布，结果用中位数（四分位数间距）表示，采用非参检验进行统计分析。如果分析提示性别或性别×分组（衰老或处理因素）的交互效应对成绩有影响，则采用―单性别‖的方差分析或者非参数检验 进一步检测同性别下的分组效应。显著性意义水平设定为*P*0.05。所有分析由SPSS 16.0 for Windows分析软件完成。

## 3. 结果

### 3.1. 小鼠每月体重变化情况（月龄：3−9月）

重复测定方差分析结果提示性别对体重有显著影响[*F*(1,50) = 381.339, *P*<0.001]。分别分析各个组性别差异，发现各组均有雌鼠体重低于雄鼠（*Ps*<0.05）。分别分析雄鼠和雌鼠的结果显示，老年对照组和阿卡波糖组和两个DNJ处理组小鼠体重无明显差异[*F*(3,21) = 0.822, *P* = 0.496; *F*(3,23) = 1.922, *P* = 0.154]，（见表2-1）。

23

表2-1 各组SAMP8小鼠从3月至9月龄的体重

Table 2-1. The dynamic body weight(g) in SAMP8 mice from 3- to 9-month

|  | 月龄 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 老年对照组 | 只 数  (M/F) | 8/8 | 8/8 | 8/8 | 7/8 | 7/7 | 6/7 | 6/6 |
|  | M | 31.9±1.8 | 33.2±2.7 | 33.2±2.8 | 32.9±3.8 | 32.2±3.4 | 31.6±2.7 | 32.7±2.4 |
|  | F | 23±2.7 | 25.5±2.6 | 25.7±2.6 | 25.5±3.2 | 26.4±2.8 | 24.3±1.9 | 22.9±3.3 |
| 阿卡波糖  组 | 只数  (M/F) | 8/8 | 8/8 | 7/8 | 7/8 | 6/7 | 5/6 | 5/5 |
|  | M | 30.4±2.4 | 30.0±2.6 | 31.3±3.0 | 31.8±3.2 | 33.7±2.6 | 33.0±2.0 | 33.1±3.1 |
|  | F | 24.5±1.8 | 26.1±1.7 | 26.9±2.1 | 27.8±1.8 | 28.1±1.7 | 26.5±2.3 | 25.6±1.4 |
| HD-DNJ  组 | 只 数  (M/F) | 8/8 | 8/8 | 8/8 | 8/8 | 7/8 | 6/8 | 6/8 |
|  | M | 32.6±1.6 | 33.3±1.4 | 33.9±1.1 | 31.8±3.5 | 34.2±1.5 | 34.3±0.2 | 33.7±1.5 |
|  | F | 24.0±2.7 | 26.1±3.0 | 26.8±3.3 | 27.2±3.3 | 28.0±2.8 | 25.3±1.3 | 24.4±1.0 |
| LD-DNJ  组 | 只数  (M/F) | 8/8 | 8/8 | 8/8 | 8/8 | 8/8 | 8/7 | 8/7 |
|  | M | 31.9±1.5 | 32.5±2.2 | 33.2±2.0 | 34.7±3.2 | 35.2±2.6 | 32.2±2.4 | 33.3±2.3 |
|  | F | 24.6±2.0 | 24.3±1.5 | 24.7±1.3 | 25.9±2.1 | 25.7±1.8 | 23.9±2.2 | 23.5±2.1 |

M: male 雄鼠; F: female 雌鼠

24

安徽医科大学博士学位论文

表2-2. SAMP8小鼠的感觉运动和探索运动焦虑试验成绩

Table 2-2. Performance of the SAMP8 mice in the sensorimotor task and locomotor- and anxiety-based tasks

| 任务 | 指标 | 老年对照组 | 青年对照组 | 阿卡波糖组 | HD-DNJ 组 | LD-DNJ 组 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 平衡木 | 平衡木平衡时间 | 91.5 ± 10.2 | 136.2 ± 10.3 \* | 105.2± 11.4 | 129.6 ± 9.2 \* | 90.5± 13.3 |
| 紧绳 | 紧绳悬挂时间 | 44.2 ± 3.4 | 56.2 ± 1.8 \* | 55.6± 1.8 \* | 55.1± 1.9 \* | 53.4 ± 2.3 \* |
|  | 紧绳分 | 53.9 ± 3.5 | 86.3 ± 4.2 \* | 66.7± 6.0 | 77.6±5.7 \* | 68.4± 7.0 |
| 旷场 | 潜伏期（秒） | 6.36 ± 0.7 | 11.7± 1.7 \* | 11.0 ± 1.4 \* | 10.9 ± 1.3 \* | 8.5 ± 1.0 |
|  | 跨格子数 | 123.6 ± 6.5 | 159.3 ± 9.7 \* | 116.8 ± 8.9 | 121.4 ± 6.0 | 106.6 ± 7.0 |
|  | 周边时间（秒） | 237.9 ± 10.8 | 255.0 ± 13.6 | 234.3 ± 14.1 | 241.3 ± 12.0 | 230.9 ± 10.9 |

\* *P*<0.05.

25

### 3.2. 行为学结果

#### 3.2.1. 感觉运动能力

平衡木性别对平衡木平衡时间有显著影响。分组分析发现，在老年组、两个

DNJ组和阿卡波糖组的雄鼠成绩均较雌鼠差(*Ps*<0.05)。性别对青年鼠平衡木时间无显著影响（*P*> 0.05）。组别对平衡木平衡时间有显著效应[*F*（4,58） = 4.823, *P* =

0.002]. 进一步分析发现，老年对照组小鼠平衡时间明显低于青年鼠(*P* = 0.007)，该年龄效应在雄鼠(*P* = 0.032)和雌鼠(*P* = 0.033)内均存在。阿卡波糖对平衡时间无显著影响(*P* = 0.385). HD-DNJ组小鼠的平衡木时间显著长于老年对照鼠(*P* = 0.029)，并且也长于LD-DNJ组(*P* = 0.041)。性别分别分析时，HD-DNJ的效应不显著（*Ps* >

0.05）. LD-DNJ组小鼠的平衡木时间与老年对照鼠无明显差异(*P*> 0.05)。

紧绳雄鼠平衡悬挂时间显著短于雌鼠[*F*(1, 61) = 4.386, *P* = 0.041]，分组分析性别差异不显著(*Ps*> 0.05). 性别对紧绳分无显著影响[*F*(1, 61) = 0.021, *P* = 0.884]. 组别对小鼠平衡时间[*F*(4,58) =4.729, *P* = 0.002]和紧绳分[*F*(4,58) = 5.833, *P* = 0.001]有

显著影响。老年对照组小鼠平衡时间和紧绳分明显低于青年鼠(*P* = 0.005)，差异主要见于雄鼠(*P* = 0.006)，见表格1。阿卡波糖小鼠平衡悬挂时间显著长于老年对照组小鼠(*P* = 0.002)，主要归功于雄鼠(*P* = 0.008)。老年对照组小鼠平衡悬挂时间低于HD-DNJ组(*P* = 0.004) 和LD-DNJ组小鼠(*P* = 0.018)，主要归功于雄鼠（*P* = 0.008；

*P* = 0.012）。老年对照组小鼠紧绳分明显低于HD-DNJ组小鼠(*P* = 0.020)。阿卡波糖组和LD-DNJ组小鼠和老年对照组小鼠紧绳分无显著差异(*P* = 0.581; *P* = 0.141)。雌鼠内组别对平衡时间无显著影响(*P*> 0.05)。

#### 3.2.2. 探索行为和焦虑任务

旷场组别对小鼠离开第一个格子的潜伏期[*F*(4,58) =3.199, *P* = 0.021]、跨格子数[*F*(4,58) =9.564, *P*<0.001]有显著影响，对周边时间无显著影响[*F*(4,58) =1.528, *P* =

0.209]. 性别和性别×分组的交互对旷场成绩无显著影响(*Ps*> 0.05). Post hoc分析发现老年对照组潜伏期明显较青年组短（*P* = 0.006），提示老年组焦虑性降低；老年

26

对照组小鼠跨越格子数较少(*P* = 0.002)，提示老年对照探索运动能力降低。阿卡波糖升高了老年鼠潜伏期(*P* = 0.044)，但对跨域格子数和周边时间无显著影响（*Ps* >

0.05）. 与老年对照组相比，HD-DNJ组潜伏期较长(*P* = 0.045). LD-DNJ组小鼠和老年对照组小鼠旷场成绩无显著差异(*Ps*> 0.05)，见表格2-2。

#### 3.2.3 Morris水迷宫

定位航行试验重复测定方差分析结果显示组别对游泳速度[*F*(4,53) = 21.120, *P* <

0.001]和游泳距离[*F*(4,53) = 4.474, *P* =0.004]有显著影响。老年对照组小鼠游泳速度明显低于青年鼠(*P* <0.001)，和阿卡波糖组、DNJ组小鼠速度无明显差异（*Ps*> 0.05）。因此，以小鼠游泳路程作为评价空间学习记忆能力的指标。总体分析小鼠的游泳路程随天数逐渐减少[*F*(9,549) = 12.552, *P*<0.001]。分组分析发现，阿卡波糖组、DNJ高剂量组、DNJ低剂量组、青年对照组小鼠的游泳距离随天数降低（*Ps*<0.05），表明这些组小鼠能够很好地学习这个任务，而老年对照组小鼠游泳距离随天数下降的趋势未达到统计显著性[*F*(9,99) = 0.965, *P* = 0.476] (见图2-2B)。老年对照组小鼠路程明显长于青年鼠（*P* = 0.001）。阿卡波糖组小鼠路程明显较老年对照组短（*P* =

0.016). HD-DNJ组小鼠和LD-DNJ组小鼠路程均显著较老年对照组短(*P* = 0.017; *Ps*

= 0.029）. 性别、分组×性别、分组×天、性别×天、分组×性别×天的交互作用对路程无显著影响(*Ps*> 0.05)。

探索期组别对小鼠靶象限游泳路程百分比有显著影响[*F*(4,58) =3.815, *P* = 0.015]老年对照组小鼠靶象限游泳路程百分比明显低于青年鼠(*P* = 0.012)，反映了衰老效应，见图2-2C。阿卡波糖缓解了这一改变(*P* = 0.046). HD-DNJ组小鼠靶象限路程百分比明显高于老年对照组小鼠(*P* = 0.037)，而LD-DNJ组小鼠成绩边缘性高于老年对照组小鼠(*P* = 0.082)。性别和分组×性别的交互作用对靶象限路程百分比无显著影响(*Ps*> 0.05)。

27

安徽医科大学博士学位论文



**图2-2** **各组SAMP8小鼠在Morris水迷宫中的学习记忆能力**

图A、B分别代表SAMP8小鼠在定位航行期中的游泳速度和寻找平台所经历的游泳路程，图C代表小鼠在探索期靶象限游泳路程占总游泳路程的百分比。\*表示与老年对照组比较有显著性差异（*P* <0.05）

**Fig 2-2. Performance of SAMP8 mice in the MWM**

Swimming velocity (A) and distance (B) in the place-learning phase; the percentage of distance (C) in the target quadrant in the probe trial. \* Compared to the old control group, *P*<0.05

28

#### 3.2.4 NOR试验

在采样期，老年对照、青年对照和DNJ组小鼠探索两个相同物体所花费的时间基本相同，提示对相同物体无探索倾向。在10-min延迟相，组别对探索总时间(Tt) [*F*(4,58) =18.012, *P*<0.001]和PI值[*F*(4,58) =13.115, *P*<0.001]有显著影响。青年组、

阿卡波糖组、DNJ组小鼠的PI值显著高于50 % (*Ps* <0.05)，而老年对照组PI值与50 %无明显差异（*P>* 0.05）. 老年对照组小鼠Tt和PI均明显低于青年鼠（*Ps*<0.001）. 阿卡波糖PI高于同年龄对照(*P*<0.001). 老年对照组PI值明显低于HD-DNJ组和LD-DNJ组小鼠(*Ps*<0.001). 两个剂量的DNJ组小鼠成绩无显著差异(*P*> 0.05). 在24-h延迟选择相，组别对Tt有显著影响[*F*(4,58) =18.012, *P*<0.001]，但未显著影响

PI值[*F*(4,58) =17.227, *P*<0.001]。老年对照组小鼠Tt低于青年鼠（*P*<0.001）。性别和分组×性别的交互作用对两个选择相的成绩无显著影响（*Ps*> 0.05），见表2-3。

#### 3.2.5 NLR试验

在样本期，各组小鼠对两个相同物体探索时间无差异，未表现出探索偏爱。在10-min延迟相，在10-min延迟相，组别对探索总时间(Tt) [*F*(4,58) =5.889, *P* =

0.001]和PI值[*F*(4,58) =8.398, *P*<0.001]有显著影响。老年对照组小鼠Tt明显较青年鼠低（*P* = 0.030）. 阿卡波糖和DNJ对Tt无显著影响（*Ps*> 0.05）. 青年鼠、阿卡波糖组、DNJ组小鼠的PI值显著高于50 % (*Ps* <0.05)，但老年对照鼠PI与50 %无明显差异(*P*> 0.05). 老年对照组小鼠PI值明显低于青年鼠(*P*<0.001). 阿卡波糖小鼠的PI值显著高于老年对照组(*P*<0.001). HD-DNJ组和LD-DNJ组小鼠PI高于老年对照(*Ps* <0.001). 在24-h延迟相，各组间Tt和PI值无显著差异（*Ps*> 0.05）. 性别及分组×性别的交互作用均未显著影响NLR成绩（*Ps*> 0.05），见表2-3.

#### 3.2.6 情景记忆

表2-3展示了每组小鼠Tt、PIo值和PIod值。各组Tt、PIo、PIod值均有显著差异[*F*(4,58) = 48.512, *P*<0.001; *F*(4,58) = 39.097, *P*<0.001; *F*(4,58) = 3.36, *P* = 0.019]。

老年对照鼠Tt低于青年鼠、阿卡波糖鼠、HD-和LD-DNJ组小鼠(*Ps* <0.05)。单

29

样本T检验显示青年鼠、阿卡波糖组、HD-和LD-DNJ组小鼠PIo和PIod值显著高于50% (*Ps*<0.05)，而老年对照PIo和PIod值与50%无显著差异（*Ps*> 0.05）. 老年对照PIo和PIod值均低于青年鼠（*P* <0.001; *P* = 0.020）. 阿卡波糖缓解了衰老对PIo和PIod值的影响(*P* <0.001; *P* = 0.015). 老年对照PIo低于HD-和LD-DNJ组小鼠(*Ps* <0.001). 老年对照PIod低于HD-和LD-DNJ组小鼠(*P* = 0.019; *P* =

0.021）. 性别和性别×分组的交互作用对情景记忆成绩无显著影响。

表2-3. SAMP8在记忆试验中的成绩

Table 2-3. Performance of the SAMP8 mice in the memory tasks

| 任务 | 试验期 | 指标 | 老 年 对 照  组 | 青 年 对 照  组 | 阿卡波糖组 | HD-DNJ 组 | LD-DNJ  组 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 新物体  再认 | 10-min  延迟相 | Tt (s) | 7.7 ± 0.6 | 13.0± 1.4 \* | 7.8 ± 0.7 | 6.7 ± 0.3 | 7.6 ± 0.6 |
| PI (%) | 49.2 ± 2.6 | 62.6 ± 1.1 \* | 66.2 ± 3.5 \* | 65.8 ± 3.0 \* | 63.2 ± 3.4 \* |
|  | 24-h  延迟相 | Tt (s) | 6.4 ± 0.3 | 12.2 ± 1.0 \* | 7.3 ± 0.7 | 7.2 ± 0.4 | 7.2 ± 0.3 |
| PI (%) | 48.5 ± 3.1 | 47.4 ± 1.7 | 48.3 ± 3.3 | 52.7± 3.2 | 51.6 ± 3.1 |
| 位置再  认 | 10-min  延迟相 | Tt (s) | 5.7 ± 0.5 | 8.3 ± 0.6 \* | 5.8 ± 0.9 | 5.9 ± 1.3 | 5.6 ± 0.8 |
| PI (%) | 50.4 ± 3.7 | 63.9 ± 2.8 \* | 63.0± 3.9 \* | 63.7 ± 3.4 \* | 62.1 ± 5.1 \* |
|  | 24-h  延迟相 | Tt (s) | 5.2 ± 0.6 | 6.7± 0.5 | 5.3 ± 0.6 | 5.1± 0.5 | 4.5± 0.4 |
| PI (%) | 51.6 ± 4.2 | 57.5 ± 3.1 | 50.1 ± 4.8 | 54.7 ± 4.7 | 51.1 ± 4.3 |
| 情景记忆 |  | Tt (s) | 23.1 ± 0.6 | 37.3 ± 0.7 \* | 28.1 ± 2.3 \* | 30.0 ± 1.0 \* | 35.2 ± 1.6 \* |
|  |  | PIo (%) | 50.4 ± 0.9 | 59.6 ± 1.1 \* | 57.5 ± 1.4 \* | 55.5 ± 0.9 \* | 56.4 ± 1.0 \* |
|  |  | PIod (%) | 49.6 ± 2.8 | 55.8 ± 1.6 \* | 56.1 ± 1.8 | 55.9 ± 1.9 \* | 54.8 ± 0.8 \* |

\* *P* <0.05

## 4. 讨论

### 4.1 阿卡波糖、DNJ对小鼠Th长发育的影响

30

由于体重是小鼠生长发育和健康状况的重要指标。因此，我们监测了小鼠在生长发育期每月体重变化情况。在生长发育过程中，小鼠的体重受品系、饲养环境、营养状况、活动量和健康状况影响[114]。在本实验中，对照组和阿卡波糖、DNJ处理组小鼠的生长环境相同。因此，在不同月龄时体重的动态变化间接地反映了服用阿卡波糖或不同剂量的DNJ对小鼠生长发育情况的影响。通过分析小鼠不同月龄体重指标，我们发现小鼠体重受性别影响，各组结果均显示雄鼠体重较雌鼠重，分别分析不同性别的小鼠，发现服用阿卡波糖或DNJ对SAMP8小鼠体重无显著影响。既往研究曾报道了长期服用阿卡波糖的糖尿病患者和小鼠体重减轻[109,

115]，2型糖尿病OLETF大鼠经DNJ处理体重增长较对照组缓慢[87]。研究结果的差异可能与种属、健康状况或药物剂量有关。

### 4.2. 阿卡波糖、DNJ缓解SAMP8鼠衰老相关运动能力和焦虑水平减退

在衰老过程中，人和啮齿类动物均会表现出一系列行为学变化[104-106]。在本研究中，为了评估感觉运动能力，我们选取了两个常用的行为学测试，平衡木和紧绳。我们既往的研究发现直径10mm的平衡木钢杆比直径6mm和14mm的钢杆对于检测小鼠平衡能力较为敏感，难度适中，适合于评估SAM小鼠年龄相关性感觉运动能力的变化。与平衡木相比，紧绳的难度较大，要求小鼠具有较好的肌力、运动协调能力和维持平衡能力[116]。旷场试验是用于检测自发探索运动能力和焦虑性的一个任务。跨格子数反映了探索运动活性，跨格子数越多表明小鼠自发探索活性越强，好奇心和运动能力参与影响小鼠自发探索运动，而潜伏期和周边时间是评估焦虑性的指标[116]。

跟据本研究的结果，老年对照P8鼠在紧绳、平衡木任务中感觉运动能力较青年鼠减退，尤其是老年雄鼠。老年对照鼠在MWM中游泳速度较慢也表明感觉运动能力降低。有研究观察到老年P8鼠在水迷宫任务中逃离水的动机降低，提示了老年P8焦虑性降低也可能参与了其游泳速度的变化[103]。尽管有许多关于人类和啮齿类动物研究显示衰老相关焦虑升高[117, 118]，对于P8鼠焦虑性的既往研究发现，

31

在食物恐新试验，老年P8鼠未出现食物恐新的表现，在饮水冲突试验中老年P8鼠电刺激惩罚性饮水次数增加，均提示了P8鼠存在衰老相关焦虑性降低[103, 119]。焦虑性降低伴随有警觉性降低，可能导致冒险行为增加，逃避危险的能力降低。有研究提出去甲肾上腺素系统的恶化可能参与了P8 鼠衰老相关的焦虑水平改变

[119]. 本实验中，老年对照组小鼠在旷场试验探索运动能力减退，同时表现出潜伏

期缩短，提示其焦虑水平下降和警觉性降低。在我们既往的研究中，老年P8雄鼠高架十字迷宫有焦虑性升高的趋势，老年P8鼠黑白巷焦虑性较低，提示P8鼠衰老过程中焦虑性变化具有性别和任务特异性，而旷场焦虑性无显著变化，可能是因为仅评估了周边时间而没有检测潜伏期[97]。

长期服用阿卡波糖的雄鼠紧绳悬挂时间较老年对照组雄鼠长，平衡木成绩无显著差异，表明阿卡波糖缓解了老年对照雄鼠在紧绳任务中的感觉运动能力减退，而对平衡木成绩无影响。DNJ组小鼠成绩分析结果显示了高剂量DNJ可以减轻老年小鼠在平衡木和紧绳这两项任务中的成绩下降，而低剂量DNJ仅在紧绳中表现出了保护作用。由于平衡木和紧绳的设计有差异而且难度不同，我们的结果提示阿卡波糖和低剂量DNJ 可能对于改善难度较大的紧绳成绩更为有效。而同剂量

DNJ在缓解感觉运动能力的作用优于阿卡波糖。此外，阿卡波糖和DNJ对MWM中游泳速度和旷场试验中的探索运动并无影响。在焦虑水平方面，阿卡波糖组雄鼠旷场潜伏期较对照组长，提示阿卡波糖缓解了衰老小鼠的焦虑性降低。HD-DNJ也缓解了旷场焦虑性降低，而LD-DNJ对此并无影响。

### 4.3. 阿卡波糖、DNJ缓解SAMP8鼠衰老相关学习和记忆能力减退

大量资料表明啮齿类动物的学习和认知能力随年龄的增长而逐渐减退[105, 106，

120, 121]. MWM和位置再认都是常用于检测鼠类海马依赖的空间学习和记忆能力的任务[112]。MWM的原理是基于啮齿类动物厌恶水，通过被迫游泳，每天根据空间线索学习和记忆水池中可供逃生的平台的位置。我们小组以往的研究曾利用MWM检测发现P8鼠在8月龄开始出现空间学习能力下降并随衰老加重[122]。位置再认试验是利用啮齿类动物天生具有对在新位置上的物体的探索偏爱。位置再认试验

32

成绩对衰老效应敏感，例如，老年CD1小鼠在该任务中位置再认能力显著减退[112]。长期高脂饮食的中年C57BL/6小鼠位置再认记忆成绩显著下降[123]。而长期体育锻炼能够改善老年小鼠位置再认记忆[39]。新物体再认任务的程序与位置再认相似，但它是一个用于检测非空间学习和记忆的变化的任务，依赖于边缘皮质[124]。该试验原理基于小鼠天生对新鲜物体的探索倾向性。位置再认和新物体再认任务由于操作简单，耗时短，不需要外在刺激，对动物应激压力小，对动物体能要求低，从而被视为较理想的再认记忆能力检测任务，倍受学者们的青睐[125]。我们以往的研究采用新物体再认实验检测小鼠再认记忆，结果发现昆明小鼠雌鼠具有衰老相关物体再认记忆损害[116]。

本实验中，老年对照P8鼠在MWM的定位航行任务中寻找平台所花费的游泳距离较长，显示了衰老相关的空间学习能力损害。老年鼠在探索期中靶象限游泳路程百分比低，反映了空间记忆能力损害。在位置再认任务，老年对照鼠花费了大致相同的时间探索移动和未移动的物体，在延迟10分钟试验中优先指数显著低于对照组小鼠，表明存在衰老相关短期空间学习和记忆能力损害。在新物体再认任务中，老年鼠区别新旧物体的记忆能力也出现了降低。

阿卡波糖组在MWM中成绩较好，在位置再认和新物体再认任务10分钟延迟相的PI值较高，表明阿卡波糖缓解了老年P8鼠空间学习和记忆能力降低和非空间的物体再认能力的损害。与阿卡波糖组相似的，HD-DNJ组小鼠在MWM两个阶段试验中成绩均较好，表明HD-DNJ可以缓解衰老相关空间学习和记忆下降。LD-DNJ缓解了小鼠定位航行期空间学习记忆减退，但是在检测记忆巩固的探索期实验中，LD-DNJ小鼠仅表现比老年对照小鼠成绩较好的趋势，无显著差异。在位置再认和新物体再认任务中，DNJ能够提高10分钟延迟相中小鼠的PI值，提示

DNJ对于老年P8鼠短期物体再认记忆有保护作用。关于热卡限制的研究也有相似的结果，能够提高老年C57BL/6或SAMP8小鼠在MWM中的学习记忆能力和被动回避任务成绩[107, 126]。

在人类中，情景记忆是指一种对于过去经验的有意识的回忆，包括发生了“什么”事情、“在哪里”发生、“何时”发生，即事件的内容，时间和地点，这种

33

记忆能力可以通过语言交流进行评估[127]。啮齿类动物也拥有与人类的情景记忆类似的情景样记忆。为了分析小鼠的情景样记忆，我们在本实验中使用了Dere等人的实验设计[113]。该装置包含了情景记忆的三要素“内容”（物体）、“时间”（物体出现的时间顺序）和“地点”（物体位置移动）。本研究中，老年对照组小鼠在试验中没有表现任何对于物体探索的偏爱或倾向性，表明其出现了情景样记忆损害。海马对于事件的内容，时间和地点三个要素信息的整合具有重要作用。年龄相关的海马退行性变可能是导致老年对照组小鼠情景样记忆力下降的原因[128]。阿卡波糖组和DNJ组小鼠花费了相对较长的时间探索旧的熟悉的对象，说明它们能够认出之前探索过的对象（事件的内容），能够区分它们的出现次序（事件的时间）；而且这两组小鼠探索旧的移动的物件的时间显著长于探索旧的静止的物体的时间，表明它们具有对物体的空间位移的记忆（事件的地点）。这些研究结果表明，长期服用阿卡波糖和DNJ减轻了P8小鼠年龄相关的情景样记忆下降。

## 5. 小结

本实验中，老年对照组小鼠感觉运动能力减退、旷场焦虑性降低、而且在MWM、位置再认、新物体再认和情景记忆任务中成绩较差，表明P8鼠具有衰老相关的多方面（空间和非空间）学习和记忆能力损害。长期服用阿卡波糖和DNJ不影响P8小鼠生长发育，但能够缓解P8鼠衰老相关运动能力和焦虑水平降低，以及学习和记忆能力减退。20 mg/ kg∙d DNJ较10 mg/ kg∙d DNJ效果好。这些结果提示了在行为学水平上，长期服用阿卡波糖和DNJ具有延缓脑衰老的作用。

34

# 第三章 长期口服阿卡波糖和DNJ缓解P8鼠衰老相关行为学改变的机制探索

## 1. 前言

人类或动物在自然衰老的过程中，脑内发生一系列的病理生理改变，包括神经内分泌改变、能量代谢和糖利用率降低、氧化应激增加、蛋白合成折叠异常、神经递质合成和释放障碍、胶质细胞活化、慢性炎性反应等。这些病理生理改变与衰老过程中认知功能损害密切相关。

在本研究的第二章实验内容中，我们系统地检测了长期口服阿卡波糖和DNJ对SAMP8鼠衰老相关行为学改变的影响。阿卡波糖和DNJ的降糖机制是通过竞争性抑制α-葡萄糖苷酶，抑制肠道糖吸收，从而降低血糖，增加胰岛素敏感性。这两种药物还具有降血脂，保护血管的作用。阿卡波糖能够稳定动脉斑块，保护心血管系统。DNJ还具有抗病毒，抗肿瘤转移等多方面作用。由于既往一些研究提示了热卡限制模拟物和治疗糖尿病的药物具有延缓脑衰老的作用，我们认为阿卡波糖和DNJ可能延缓脑衰老进程。本研究第二章的行为学实验结果显示了阿卡波糖和DNJ缓解了老年P8鼠的行为学改变，尤其是缓解了学习记忆能力的减退。然而，其机制尚不明确。其中可能涉及衰老相关的病理生理标志物改变和表观遗传学变化。

研究发现，中枢神经系统内的胰岛素信号发挥着重要的生理作用，包括参与调节能量代谢，神经元和胶质细胞的生存状态[129, 130]。在衰老的脑组织中，胰岛素受体（InsR）减少、胰岛素信号水平降低[12]。目前，有越来越多的证据表明中枢胰岛素活性参与调节突触可塑性，进而影响认知功能[17, 131, 132]。例如，在老年啮齿类动物的大脑中，胰岛素、InsR水平均有下降[12, 13]。经侧脑室注入胰岛素能够提高大鼠InsR表达[17, 47]。临床试验发现，无论是1型还是2型糖尿病患者发生痴呆的风险均大大增加[133, 134]。即使在无糖尿病的老年人群中，糖耐量降低也参与了海马体积缩小和认知成绩下降[135]。此外，胰岛素抵抗与AD患者的认知缺陷也有密

35

切关系[20, 136]。AD和轻度认知障碍患者脑脊液中胰岛素水平减少[137]。

糖代谢对认知功能具有重要影响。FDG-PET已经证实在早期AD患者痴呆发生之前数年便能观测到额颞叶、顶叶及扣带回皮层的葡萄糖代谢速率下降[24]。补充葡萄糖能够有效提高AD或唐氏综合征患者的认知功能，对正常成人也显示这种功效[23, 25]。而胰岛素缺乏或抵抗导致的高糖血症也会损伤认知功能，其机制可能涉及氧化应激、O连接的糖基化，终末糖基化产物的增加[26]。

IGF-1和BDNF是中枢神经系统中重要的神经营养因子，它们激活的信号通路与胰岛素信号有很大程度重叠，包括磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K) /Akt和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路[138]。IGF-1介导生长激素作用，参与个体生长发育。IGF-1的结构和功能与胰岛素相似，主要与IGF-1R结合，也可与胰岛素受体结合。IGF-1作为一种非选择性神经营养因子，不仅对脑组织的生长发育起重要作用，还参与神经功能的维护，对认知功能具有重要的调节作用[139]。在衰老过程中，IGF-1水平降低，尤其是脑IGF-1功能降低可能参与了衰老相关的认知能力下降[140]。AD动物模型IGF-1信号降低伴随着脑IGF-1R表达升高，也与认知减退关系密切[61]。

BDNF在改善糖代谢，提高细胞应激抵抗力，调节突触可塑性，神经发生和学习记忆中有重要作用[141]。BDNF能增加突触前蛋白水平，如突触短杆素、syntaxin，促进神经递质传递[142]。正常衰老的学习记忆功能障碍与脑组织中，特别是海马神经元的BDNF信号降低有关[138]。热卡限制和体育锻炼均可促进BDNF产生，提高脑功能[43, 108]。在衰老过程中，脑内IGF-1和BDNF水平逐渐降低，并且与衰老相关的脑功能损害密切相关[12, 138]。

学习记忆能力减退，作为脑衰老的一个典型的外在行为学表现，其直接机制与神经元突触结构变化和递质传递效能异常有关[143]。目前的证据表明海马和新皮质特定环路中特异性突触蛋白含量或功能紊乱将引起突触可塑性改变，导致学习记忆功能损害[144]。衰老相关性学习记忆能力下降是脑衰老的重要症状。脑的学习记忆功能机制复杂，仍未探明。尽管如此，目前研究认为在记忆存储的过程中涉及到神经元网络中突触连接结构和突触传递效率的调节，海马和新皮质中的特定突触蛋白改变参与了突触功能变化，从而对学习和记忆过程有重要影响[13]。衰老

36

相关性认知损害可能与特异性突触蛋白的水平和功能改变有关。

突触由突触前、后膜和突触间隙组成。在经典的突触传递过程中，动作电位传至突触前末梢，开放电压门控的钙通道，钙离子内流导致突触前活性带钙离子浓度升高，激活出胞过程，释放递质到突触间隙。参与这一过程的突触前活性带蛋白包括，钙离子感受器(synaptotagmins)，膜融合蛋白(SNARE)复合体（突触短杆素/VAMP, syntaxin1, 和SNAP-25），其它调节性结合蛋白（如rab3, munc18）等[145,

146]. 其中，Syt 1是位于突触前膜活性带的一个重要的膜蛋白，作为Ca2+感受器，其碳端可与Ca2+结合，继而与SNARE复合体结合，介导突触囊泡与突触前膜融合，突触递质释放[145]。我们既往的研究发现老年SAMP8鼠背侧海马Syt 1水平增加，而且与年龄相关的学习记忆损害呈正相关[122]。Stx 1是SNARE蛋白复合体的组成成分，参与调节神经传递。在正常衰老小鼠和AD转基因小鼠中脑组织中Stx 1表达水平随年龄增加而减少[147, 148]。

此外，神经炎症作为细胞衰老及机体老化的伴随反应，在正常衰老过程以及脑衰老的发生发展中也发挥了重要的作用[149]。炎性可能增加衰老相关疾病的发生风险，包括肥胖、2型糖尿病以及神经退行性疾病等。随着衰老进程，中枢神经系统内免疫调节功能逐渐损害，脑功能和免疫系统的高度协调的相互作用发生改变

[150]. 老年人暴露于炎症应激时会产生过度的炎症反应和一系列不良后果[151]。过度

的神经炎症反应表现为效应细胞星形胶质细胞和小胶质细胞的增生活化，促炎症因子的大量分泌[152]。其中，星形胶质细胞是导致神经炎症的主要效应细胞。在生理状态下，星形胶质细胞-神经元网络通过释放神经营养因子进行相互作用，而且星形胶质细胞包含许多神经递质受体，从而能够监视突触活动，因此星形胶质细胞对维持脑功能稳态有重要的作用[153]。星形胶质细胞对各种神经退行性损伤反应迅速，导致自身增生活化。活化的星形细胞分泌多种神经毒性物质，表达神经胶质纤维酸性蛋白（GFAP）水平升高[154]。由于GFAP表达水平与星形细胞激活增生密切相关，因此被认为是星形胶质细胞的活化标记物。星形胶质细胞活化不仅参与脑衰老，还参与了多种神经变性疾病的发病，包括阿尔茨海默氏病、炎性脱髓鞘疾病、人免疫缺陷病毒（HIV）相关的痴呆、急性脑创伤性损伤以及朊病毒海绵

37

状脑病[154, 155]。长期过度的神经炎症会增加氧化应激，细胞器功能障碍，促凋亡信号，进而对神经元可塑性产生多种负面影响，包括抑制神经生长、LTP产生、树突形态改变等，从而导致脑功能损害[150, 156]。

许多研究提示衰老与脑特定区域的基因表达改变有关[157]。在脑衰老的过程中，基因的表观遗传改变可能参与了认知能力的下降。环境因素可导致表观遗传改变，即DNA核苷酸序列不发生改变的情况下，基因表达活性的可遗传的变化。长时程记忆形成过程需要基因转录和新蛋白合成，因此受表观遗传学改变的影响[157]。其中，组蛋白修饰就是表观遗传的一个重要类型，包括组蛋白的甲基化、乙酰化、磷酸化等修饰。染色质的基本结构单位——核小体由组蛋白八聚体（H2A、H2B、

H3和H4各二个分子）构成的核心结构和盘绕其外的DNA分子构成[158]。组蛋白乙酰化是指在组蛋白乙酰化转移酶（HAT）的作用下，乙酰基转移到核小体中组蛋白核心结构N端碱性氨基酸集中区的特定的赖氨酸残基上的过程。组蛋白去乙酰化酶（HDAC）催化相反的过程，使组蛋白发生去乙酰化。细胞核中的组蛋白乙酰化水平受这两种酶的共同调控。组蛋白发生乙酰化修饰后，可打开一个开放的染色质结构，使组蛋白和DNA相互作用的稳定性降低，基因的表达增加[159]。此外，组蛋白编码假说的核心思想认为某些特定蛋白的结合域能够识别发生了乙酰化修饰的组蛋白，因此组蛋白乙酰化可以直接募集这些蛋白，其相互作用发挥改变染色质结构或促进转录的作用[160, 161]。另一方面，组蛋白去乙酰化则抑制了基因的转录。

研究发现特定位点组蛋白乙酰化参与长期记忆形成所需的蛋白的转录和合成过程[162]。其中，组蛋白H3赖氨酸位点9（H3K9）和H4赖氨酸位点8（H4K8）乙酰化与认知能力关系密切。进行了空间记忆任务的大鼠海马中组蛋白H3K9乙酰化水平升高[163]。组蛋白H4K8乙酰化也被报道能够激活基因转录，提高长时记忆[164]。

在本研究的第二章中，根据行为学实验结果，我们发现老年P8鼠的运动能力、旷场焦虑水平、空间和非空间学习和记忆能力、情景记忆能力均下降，长期服用阿卡波糖或DNJ成功缓解了老年P8鼠的衰老相关性认知能力损害。在此基础上，

38

本章节研究进一步探讨了阿卡波糖和DNJ对P8鼠脑衰老相关性病理生理改变和表观遗传学变化有无影响。①对于胰岛素系统指标，我们拟采用酶联免疫吸附剂测定(ELISA)方法检测血清中葡萄糖和胰岛素，采用免疫组织化学方法检测海马不同亚区InsR水平，分析这些指标与小鼠学习记忆能力减退的相关性。②采用ELISA方法测定血清中IGF-1和BDNF的水平，采用免疫组织化学方法检测海马不同亚区IGF-1R和BDNF含量。此外，③我们拟采用免疫组织化学方法检测海马突触前活性带蛋白质Syt 1和Stx 1的含量以及GFAP表达情况，以了解星形胶质细胞活化状态；④检测海马组蛋白H4K8和H3K9乙酰化水平，并探讨这些指标改变与学习记忆能力衰退的关系。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 标本制备

在完成行为学测试10天后进行标本制备。将小鼠用氟烷麻醉，迅速移除眼球

取血，将小鼠引颈脱臼处死，迅速进行冰上开颅取脑。所取血标本经12000转离

心10分钟，收集血清，快速冷冻在−80℃冰箱用于以后的分析。所取脑组织经中间矢状平面平分左右半球，浸泡于4%的多聚甲醛溶液中固定12小时后，流水缓慢冲洗4小时终止固定反应。将脑组织常规脱水浸蜡，石蜡包埋，连续冠状切片获取6μm厚度的组织切片，用于免疫组织化学。最终进入血清学检测和免疫组化染色的小鼠只数为老年空白组12只（6雄，6雌），阿卡波糖组11只（5雄，6雌），20 mg/ kg∙d DNJ组13只（6雄，雌7），10 mg/ kg∙d DNJ组14只（7雄，7雌），青年对照组12只（6雄，6雌）。实验在双盲条件下进行。

### 2.2 主要实验试剂

#### 2.2.1. ELISA所需试剂

小鼠血糖ELISA检测试剂盒、小鼠血胰岛素检测试剂盒、小鼠血IGF-1检测试剂盒和小鼠血BDNF检测试剂盒（中国碧云天生物科技有限公司）。试剂盒组成：微孔酶标板、标准品、样本稀释液、辣根过氧化物酶（HRP）标记的检测抗体、

20×洗涤缓冲液、底物A、底物B、终止液、封板膜。双蒸去离子水（ddH2O）。

39

#### 2.2.2. 免疫组织化学所需试剂

一抗试剂：兔源性抗胰岛素受体多克隆抗体（rabbit polyclonal Anti-insulin

receptor; abcam 公司，美国）；兔源性抗IGF-1R多克隆抗体（ab131476, Abcam公司）；兔源性抗BDNF多克隆抗体（ab72439, Abcam公司）兔源性抗Syt 1多克隆抗体（sab4502907, Sigma公司, 美国）；兔源性抗Stx 1多克隆抗体（Ab5820，

Abcam公司）；兔源性抗GFAP多克隆抗体（Z0334，dako公司，丹麦）；美国兔源性抗组蛋白H3K9乙酰化多克隆抗体（ab10812, abcam公司），兔源性抗组蛋白

H4K8乙酰化多克隆抗体（ab15823, abcam公司）。

二抗试剂盒：生物素标记羊抗兔IgG链霉亲和素-生物素复合物（strept avidin-biotin complex, SABC）法超敏试剂盒（SA1022，武汉博士德生物工程有限公司）；二氨基联苯胺（Diaminobenzidine, DAB）显色试剂盒（ARl022，武汉博士德生物工程有限公司）；5 % 牛血清白蛋白；PBS缓冲液（pH 7.2−7.4，ZLI-9062，

0.01mol/L，北京中杉金桥生物科技有限公司）；柠檬酸盐缓冲液（pH 6.0，ZLI-9065，

0.01mol/L，北京中杉金桥生物科技有限公司）；双蒸去离子水（ddH2O）；4%多聚甲醛；0.3%过碘酸；二甲苯；乙醇（75%乙醇、95%乙醇、无水乙醇）；中性树胶。

### 2.3 主要实验材料和仪器

#### 2.3.1. ELISA所需器材

酶标仪（450nm）；EP管和离心管；微量加样器（10l、100l、200l、1000

l）和枪头；4°C和−20°C冰箱（美菱）；−80°C 超低温冰箱（中科美菱）；37°C温箱（上海医疗器械厂）；纯水机（HB-RO/05，杭州惠邦净水设备有限公司）。

#### 2.3.2. 免疫组织化学所需器材

4℃高速离心机（5417R eppendorf centrifuge公司）；90℃烤箱（O/BKYY10-1996上海跃进医疗器械厂）；生物组织自动脱水机（8T．12K，湖北省孝感亚光医用电子技术研究所）；石蜡包埋仪（BM-Ⅱ型，安徽电子科学研究所）；石蜡切片机（LEICA RM 2135型，上海莱卡仪器有限公司）；切片漂烘温控仪（QPB2，安徽省电子科学研究所）；微波炉（上海中达医药应用研究所）；精密电子天平（上海天平仪器厂）；精密pH计（PHS-3C，上海雷磁仪器厂）；免疫组化湿盒（上海亿欣生

40

物科技有限公司）；荧光正置显微镜（Olympus, 日本）；数码相机（Nikon, 日本）；图像采集系统（MetaMorph image acquisition and processing software; Universal Imaging, USA）；图像分析软件（Image-Pro Plus 6.0, Media Cybernetics公司，美国）。

### 2.4. ELISA

采用双抗体一步夹心法酶联免疫吸附试验。

#### 2.4.1. 在预包被了一抗的包被板中设置标准品孔和样本孔，标准品孔各加不同浓度的标准品50　l；样本孔先加待测样本10　l，再加样本稀释液40　l；空白孔不加。

37℃温箱温育30min。

2.4.2. 除空白孔外，标准品孔和样本孔中每孔加入HRP-检测抗体100l，用封板膜封住反应孔，37℃温箱温育30min。

2.4.3. 弃去液体，吸水纸上拍干，每孔加满洗涤液，静置1min，甩去洗涤液，吸水纸上拍干，重复洗板5次。

2.4.4. 每孔加入底物A、B各50l，37℃避光孵育15min。

2.4.5. 每孔加入终止液50l，在15min 内，在450nm 波长处测定各孔的OD值。

2.4.6. 绘制标准曲线：在Excel工作表中，以标准品浓度作横坐标，对应OD值作纵坐标，绘制出标准品线性回归曲线，按曲线方程计算各样本浓度值。

### 2.5. 免疫组织化学染色

采用SABC法行免疫组化检测。

#### 2.5.1. 切片脱蜡和水化（90℃的温箱内烤片20 min，二甲苯5 min×2次，梯度酒精 3

min×3次，PBS洗5 min×2次)。

2.5.2. 灭活内源性过氧化物酶：快速向每个脑组织滴加0.3 %过碘酸，室温下孵育1 min，双蒸水冲洗3 min×3次。

2.5.3. 组织抗原修复：将玻片置于装有柠檬酸盐溶液(0.01 mol/L, pH 6.0)的容器中，然后置于微波炉10 min +（1min加热+1min 暂停）×5次，使由醛键封闭的抗原决定簇暴露，室温中冷却30分钟，PBS冲洗5 min×2次。

2.5.4. 滴加5% BSA（牛血清白蛋白）封闭液，置于37℃温箱放置10 min，以减少非特异性染色，之后甩去多余封闭液。

41

#### 2.5.5. 滴加Ⅰ抗。根据预实验结果，确定Ⅰ抗稀释比例。抗InsR抗体稀释比例为

1: 100、IGF-1R抗体稀释比例为1: 100、BDNF抗体稀释比例为1: 200、组蛋白H3K9乙酰化抗体稀释度比例为1: 800、组蛋白H4K8乙酰化抗体稀释比例为1: 1000，孵育条件均为4℃冰箱内过夜后在37℃温箱内复温20 min。

Syt 1抗体稀释比例为1: 800、Stx 1抗体稀释比例为1: 1000、抗GFAP抗体稀释度为1: 400，孵育条件均为4℃孵育过夜，次日37℃复温10min. PBS洗5 min×3次。

#### 2.5.6. 除去PBS液，滴加生物素标记羊抗兔二抗, 37℃温箱内孵育20 min。PBS 洗

5 min×3次。

#### 2.5.7. 滴加SABC试剂（链霉菌抗生物素复合体），37℃温箱内孵育20 min。PBS

洗5 min×4次。

#### 2.5.8. 除去PBS液，每张切片加3滴新鲜配制的DAB溶液，显微镜下观察3–5 min

（镜下掌握显色程度）。InsR、IGF-1R和BDNF的DAB显色时间分别设定为染色

3 min、4 min和3.5 min. Syt 1和Stx 1的DAB显色时间分别设定为染色4 min 和

3.5 min, GFAP的DAB显色时间设定为4 min，组蛋白H3K9和H4K8乙酰化DAB

显色时间均为3 min。

#### 2.5.9. 切片经常规脱水透明，中性树胶封固。

### 2.6 摄片及图像分析

首先用低倍镜（4×）观察并拍摄海马整体，大体观察组织免疫组化染色情况。然后用高倍镜（20×）依次拍摄每个海马的齿状回（Dentate gyrus, DG）、CA1 和

CA3亚区的不同层区。通过图像采集软件调整数码相机曝光条件设置，关闭自动白平衡。高倍镜下拍摄的层区包括DG区的门区（Hilus, HL）、颗粒细胞层（granule cell layer, GL）和分子层（molecular layer, ML）；CA1区的分子层ML、放射层

（radiation layer, RL）、锥体细胞层（pyramidal cell layer, PL）和起层（original layer, OL）；CA3区的分子层ML、透明层（Stratum lucidum, SL）、锥体细胞层PL、起层OS。

对于组蛋白乙酰化水平检测，首先用低倍镜（4×）拍摄海马整体以大体观察染

42

色情况。由于组蛋白分布于细胞核内，在低倍镜下观察到阳性免疫染色主要见于胞体集中分布的细胞层，因此在高倍镜（20×）下分别对海马DG颗粒细胞层、CA1区和CA3区的椎体细胞层进行观察、拍摄。

保存图像于电脑中，用Image-Pro Plus 6.0图像分析软件分析图片。首先启动软件的灰度矫正功能测量背景空白处的灰度值。对于单个切片的图像，计算平均背景灰度值，设置为背景扣除值，以减少背景染色对光密度值的影响。然后对海马各区域免疫反应产物进行光密度值分析。以光密度值除以分析框选取区域的面积，计算得平均光密度值（average optical density, AOD），作为分析指标，代表各个蛋白的相对水平。

### 2.7. 统计学处理

分析资料分布特征。符合正态分布的实验资料采用均数±标准误表示，非正态资料用中位数（四分位数间距）表示。采用两因素方差分析ANOVA进行统计学分析，以组别和性别作为独立变量。Dunnett检验方法分析各组与老年对照组的差异。Bonferroni检验分析HD-和LD-DNJ组小鼠的差异。如果分析提示性别或性别

×分组（衰老或处理因素）的交互效应对指标有影响，则分别分析同性别下的分组效应。用Pearson秩和检验分析认知任务成绩与生化指标之间的相关性。显著性意义水平设定为*P* <0.05。所有分析由SPSS 16.0统计软件完成。图片由Origin 7.5

Professional软件完成。

## 3. 结果

### 3.1. 长期服用阿卡波糖和DNJ对SAMP8鼠胰岛素系统的影响

#### 3.1.1. 血清中糖、胰岛素水平

各组小鼠的血糖水平无显著差异[*F*(4,58) = 1.684, *P* = 0.166]。组别对血胰岛素水平有显著影响[*F*(4,58) = 10.205, *P*<0.001]。老年对照组小鼠血胰岛素水平显著低于青年鼠（*P* = 0.001）。阿卡波糖缓解了老年对照鼠血胰岛素的降低(*P* = 0.003). HD-和LD-DNJ组小鼠的血胰岛素水平均明显高于老年对照(*P* = 0.002; *P* = 0.025). HD-和

43

LD-DNJ组小鼠的血胰岛素水平无统计学差异(*P*> 0.05)。性别、分组×性别的交互作用对血糖、血胰岛素水平无显著影响（*Ps*> 0.05），见表3-1。

#### 3.1.2. 海马各层胰岛素受体InsR水平

根据免疫组化染色图片（图3-1）可见DG、CA1和CA3的细胞层以及CA1分子层InsRs表达水平较高。ANOVA分析结果显示不同组海马所有层InsR水平存在显著差异(*Ps*<0.05). Dunnett检验分析老年对照组小鼠在海马所有层InsR水平均比青年鼠降低（*Ps*<0.05），见表3-2. 与老年对照组相比，阿卡波糖组小鼠InsR在海马DG细胞层和分子层(*P* = 0.005; *P* = 0.021), CA1所有亚层(*Ps*<0.01), CA3分子层、透明层和起层（*P*<0.001; *P* = 0.020; *P* = 0.001）水平较高。HD-DNJ组小鼠在CA1分子层、椎体细胞层和起层（*P*<0.001; *P* = 0.006; *P* = 0.044），和CA3分子层和起层(*P* = 0.039; *P* = 0.032) InsR水平较高。LD-DNJ组小鼠InsR水平与老年对照鼠无明显差异(*Ps*> 0.05). Bonferroni检验分析HD-和LD-DNJ组小鼠InsR水平差异，仅在CA3起层HD-DNJ组小鼠InsR水平明显比LD-DNJ组小鼠高(*P* =

0.005）. 性别、分组×性别的交互作用对海马各层InsR水平无显著影响(*Ps*> 0.05)。

表3-1 各组小鼠血糖及血胰岛素水平

Tab 3-1. The levels of serum glucose and Insulin in different groups of SAMP8

mice

| 分组 | 老年对照 | 青年对照 | 阿卡波糖 | HD-DNJ | LD-DNJ |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 血糖 (mmol/l) | 8.6 ± 0.4 | 8.1 ± 0.3 | 7.6 ± 0.3 | 8.7±0.2 | 8.5±0.5 |
| 血胰岛素 (mIU/l) | 9.8 ± 0.4 | 13.6 ± 0.7\* | 12.3 ± 0.5\* | 12.9 ± 0.5 \* | 11.5 ± 0.4 \* |

\*表示与老年对照组之间有显著性差异（*P* <0.05）

44

安徽医科大学博士学位论文

表3-2 各组小鼠海马不同亚层中的InsR相对含量(AOD值×100)

Tab 3-2.The relative levels of Insulin receptor in different hippocampal sublayers indicated by AOD (× 100)

| 分组 | DG |  |  | CA1 |  |  |  | CA3 |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | HI | GL | ML | ML | RL | PL | OL | ML | SL | PL | OL |
| 老年对照 | 2.17±0.33 | 4.65±0.67 | 3.06±0.42 | 3.15±0.58 | 2.72±0.44 | 4.70±0.76 | 2.65±0.60 | 2.10±0.58 | 3.64±0.71 | 6.30±0.51 | 3.23±0.42 |
| 青年对照 | 4.48±0.43\*\* | 8.50±0.66\*\* | 5.52±0.71\*\* | 6.07±0.76\* | 5.12±0.53\*\* | 7.78±0.75\*\* | 5.90±0.67\*\* | 5.07±0.57\*\* | 5.93±0.51\*\* | 8.09±0.36\*\* | 5.98±0.45\*\* |
| 阿卡波糖 | 3.21±0.33 | 7.33±0.81 \* | 4.45±0.42 \*\* | 5.99±0.40 \* | 4.81±0.49 \*\* | 7.34±0.63 \*\* | 5.08±0.60 \*\* | 4.24±0.41 \*\* | 4.88±0.47 \* | 6.35±0.38 | 4.96±0.41 \*\* |
| HD-DNJ | 3.26±0.37 | 5.61±0.51 | 3.92±0.39 | 5.40±0.47\* | 4.09 ±0.50 | 7.05±0.57\* | 4.25±0.58\* | 3.34±0.43\* | 3.89±0.44 | 6.00±0.65 | 4.41±0.38\* |
| LD-DNJ | 2.86±0.49 | 5.14±0.73 | 3.19±0.32 | 3.85±0.51 | 3.11±0.38 | 6.23±0.59 | 3.44±0.56 | 2.76±0.51 | 3.16±0.66 | 5.40±0.65 | 3.02±0.43 |

\*表示与老年对照组之间有显著性差异（*P* < 0.05）

45



**图3-1. InsR在不同分组SAMP8小鼠海马中的表达**

（A-E）分别代表老年对照组、青年对照组、阿卡波糖组、HD-DNJ组和LD-DNJ组小鼠海马InsR

表达情况；图片均放大40倍；标尺=400μm. GL，颗粒细胞层；HL，门区；ML，分子层；

OL，起层；PL，椎体细胞层；RL，放射层；SL，透明层

**Fig 3-1. The expression of the InsR in hippocampus of SAMP8 mice**

(A-E) represent the expression of InsR in the hippocampus in the old control group, young control group, acarbose group, HD-DNJ group and LD-DNJ group, respectively, each image under 40×

Magnification. Scale bar = 400μm. GL, granule cell layer; HL, Hilus; ML, molecular layer; OL, original layer; PL, pyramidal cell layer; RL, radiation layer; SL, stratum lucidum.

#### 3.1.3. 血清中糖、胰岛素水平、海马InsR水平与记忆能力的相关性

对于总体小鼠，血糖水平与记忆能力无显著相关性(*Ps*> 0.05)。血胰岛素水平与新物体再认、位置再认的PI10min呈正相关（*Ps*<0.001），与情景记忆的PIo（*r* = 0.398，

46

*P* = 0.004）和PIod (*r* = 0.325, *P* = 0.010)正相关。分别分析各组时，青年对照和阿卡波糖组小鼠血胰岛素水平与位置再认PI10min正相关，HD-DNJ和LD-DNJ组小鼠血胰岛素水平分别与情景记忆的PIo和PIod值呈正相关(*Ps*<0.05)，见表3-3。

海马InsR水平与记忆能力的相关性分析结果见表3-4. 总体分析时，CA1分子层、CA3分子层InsR水平与MWM游泳路程负相关(0.329≤*r*≤0.472, *Ps*≤0.033)。海马各层区InsR水平与新物体再认PI10min (0.401≤*r*≤0.631, *Ps*≤0.008)和位置再认的PI10min (0. 341≤*r*≤0.520, *Ps*≤0.030)正相关，与情景记忆PIo (0. 400≤*r*≤0.

638, *Ps*≤0.008)和PIod (0. 322≤*r*≤0.530, *Ps*≤0.038)正相关。分组分析，发现老

年对照组小鼠DG-门区和分子层InsR与MWM靶象限路程百分比正相关（*r* = 0.922，

*P*<0.001; *r* = 0.860, *P* = 0.003)；CA1分子层InsR水平与MWM游泳路程负相关（*r* =

−0.725, *P* = 0.015). 青年鼠，CA1细胞层InsR水平与MWM靶象限路程百分比正相关(*r* = 0.704, *P* = 0.011). CA1起层InsR水平与MWM游泳路程负相关(*r* =−0.643, *P*

=0.024）. 阿卡波糖组小鼠DG分子层InsR水平与新物体再认PI10min正相关（*r* = 0.687，

*P*=0.019）. HD-DNJ组小鼠血胰岛素水平在DG细胞层与新物体再认PI10min正相关（*P*

= 0.001)，在CA1放射层与新物体再认PI10min和情景记忆PIo正相关(*r* = 0.679, *P* = 0.008; *r* = 0.744, *P* = 0.002)，在CA1起层与MWM游泳路程负相关，与情景记忆PIo正相关(*r* =−0.629, *P* = 0.016; *r* = 0.788, *P* = 0.001). LD-DNJ组小鼠DG分子层和CA1

细胞层血胰岛素水平与新物体再认PI10min正相关(*Ps*<0.01)。

47

表3-3 小鼠血糖、血胰岛素水平与记忆能力的相关性

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 指标 | MWM |  | 新物体再认 | 位置再认 | 情景记忆 |  |
|  |  | 平均路程 | 目标象限路程百分比 | PI10min | PI10min | PIo | PIod |
|  |  | *γ*(*P*) | *γ*(*P*) | *γ*(*P*) | *γ*(*P*) | *γ*(*P*) | *γ*(*P*) |
| 总体 | 血糖 | .099(.442) | −.093(.474) | −.145(.259) | −.071(.585) | −.129(.318) | −.146(.257) |
|  | 胰岛素 | −.042(.748) | .211(.100) | .553\*\*(.000) | .540\*\*(.000) | .398\*\*(.004) | .325\*(.010) |
| 青年对照 | 胰岛素 | .182(.571) | .428(.165) | .822\*\*(.000) | −.223(.487) | .486(.110) | −.356(.256) |
| 阿卡波糖 | 胰岛素 | .536(.089) | −.543(.084) | .665\*(.026) | .035(.919) | −.161(.636) | −.394(.231) |
| HD-DNJ | 胰岛素 | .022(.944) | .059(.847) | −.253(.403) | −.272(.368) | .014(.988) | .812\*\*(.001) |
| LD-DNJ | 胰岛素 | .426(.129) | −.203(.485) | −.345(.228) | .119(.684) | .687\*\*(.007) | .512(.061) |

Table 3-3. Correlations between the levels of serum glucose and insulin and memory abilities

\* *P*<0.05, \*\* *P*<0.01.

表3-4 小鼠海马各层胰岛素受体与记忆能力的相关性

Table 3-4. Correlations between InsR in each hippocampal layers and memory abilities

| 分组 | 海马亚层 | MWM |  | 新物体再认 | 位置再认 | 情景记忆 |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  | 目标象限路程百分比 | PI10min | PI10min | PIo | PIod |
|  |  | 平均路程 |  |  |  |  |
|  |  | γ(P) | γ(P) | γ(P) | γ(P) | γ(P) | γ(P) |
| 总体 | DG-HL | −.201(.201) | .223(.107) | .423\*\*(.005) | .368\*(.024) | .549\*\*(.000) | .354\*(.032) |
|  | DG-GL | −.146(.326) | .214(.203) | .471\*\*(.002) | .470\*\*(.002) | .477\*\*(.002) | .459\*\*(.002) |
|  | DG-ML | −.244(.119) | .245(.229) | .401\*\*(.008) | .340\*(.028) | .400\*\*(.008) | .342\*(.027) |
|  | CA1-ML | −.374\*(.015) | .154(.452) | .537\*\*(.000) | .437\*\*(.004) | .488\*\*(.001) | .381\*(.013) |
|  | CA1-RL | −.329\*(.033) | .149(.488) | .496\*\*(.001) | .386\*(.012) | .517\*\*(.000) | .381\*(.013) |
|  | CA1-PL | −.143(.398) | .093(750) | .602\*\*(.000) | .376\*(.015) | .567\*\*(.000) | .322\*(.038) |
|  | CA1-OL | −.384\*(.013) | .223(.374) | .526\*\*(.000) | .341\*(.030) | .638\*\*(.000) | .426\*\*(.005) |

48

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | CA3-ML | −.472\*\*(.003) | .079(.800) | .474\*\*(.002) | .453\*\*(.003) | .593\*\*(.000) | .440\*\*(.004) |
|  | CA3-SL | −.146(.375) | -.012(.952) | .424\*\*(.005) | .460\*\*(.003) | .557\*\*(.000) | .468\*\*(.002) |
|  | CA3-PL | −.085(.584) | .025(.945) | .472\*\*(.002) | .520\*\*(.000) | .614\*\*(.000) | .530\*\*(.000) |
|  | CA3-OL | −.306 (.060) | .084(.714) | .631\*\*(.000) | .365\*(.021) | .637\*\*(.000) | .347\*(.029) |
| 老 年 对照 | DG-HL | −.277(.442) | .992\*\*(.000) | −.453(.210) | −.391(.308) | −.585(.078) | −.084(.743) |
| DG-ML | −.195(.589) | .860\*\*(.003) | −.207 (.410) | .070(.848) | −.358(.344) | −.006(.849) |
|  | CA1-ML | −.725\*(.015) | .187(.558) | .394(.284) | −.183(.594) | −.142(.667) | 142(.676) |
| 青 年 对照 | CA1- PL | .189(.626) | .704\*(.011) | .281(.401) | −.450(.142) | .019(.958) | .223(.501) |
| CA1- OL | −.643\*(.024) | .158(.624) | .179(.579) | .173(.592) | .528(.078) | .414(.181) |
| 阿 卡 波糖 | DG-ML | .355(.302) | −.494(.156) | .687\*(.019) | .161(.580) | −.347(.321) | −.323(.336) |
| HD-DNJ | DG-GL | .219(.458) | −.034(.907) | .803\*\*(.001) | .229(.431) | −.068(.817) | .123(.676) |
|  | CA1- RL | −.361(.205) | −.067(.820) | .679\*\*(.008) | .036(.902) | −.072(.806) | .744\*\*(.002) |
|  | CA1- OL | −.629\*(.016) | .151(.605) | .576(.031) | −.119(.685) | −.325(.257) | .788\*\*(.001) |
| LD-DNJ | DG-ML | .016(.961) | −.360(.250) | .755\*\*(.005) | .150(.641) | .442(.151) | .444(.149) |
|  | CA1- PL | −.373(.232) | .526(.079) | .807\*\*(.002) | −.353(.261) | −.199(.536) | −.160(.620) |

\* *P*<0.05, \*\* *P*<0.01.

### 3.2. 长期服用阿卡波糖和DNJ对P8鼠IGF-1和BDNF的影响

#### 3.2.1. 血清中IGF-1和BDNF水平

组别对血IGF-1[*F*(4,58) = 11.114, *P*<0.001]和BDNF[*F*(4,58) = 16.893, *P*<0.001]水

平有显著影响。进一步分析显示老年对照组小鼠和青年鼠的血IGF-1和BDNF水平无显著差异(*Ps*> 0.05). 阿卡波糖对血IGF-1和BDNF水平无显著影响(*Ps*> 0.05). HD-和LD-DNJ组小鼠血清中IGF-1 (*P*<0.001; *P* = 0.003)和BDNF (*P* = 0.001; *P* =

0.003）水平均明显高于老年对照组小鼠，见表3-5。性别、分组×性别的交互作用对血IGF-1和BDNF水平无显著影响(*Ps*> 0.05)。

49

表3-5 各组SAMP8小鼠血IGF-1及BDNF水平

Tab3-5. The levels of serum glucose and Insulin of SAMP8 mice

| 分组 | 老年对照 | 青年对照 | 阿卡波糖 | HD-DNJ | LD-DNJ |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| IGF-1(ng/ml) | 57.6 ± 4.0 | 57.1 ± 4.4 | 58.9 ± 2.8 | 69.4 ± 4.5\* | 67.7 ± 3.7 \* |
| BDNF (pg/ml) | 1228.5 ± 35.6 | 1209.1± 36.5 | 1196.5 ±65.6 | 1433 ± 61.2 \* | 1417.1 ±55.4 \* |

\*与老年对照组小鼠比较有显著性差异，*P* <0.05

#### 3.2.2. 海马各层IGF-1R, BDNF水平

老年对照IGF-1R 海马各层均可见阳性表达（图3-2），青年对照IGF-1R表达较弱，主要在各亚区的细胞层。青年对照BDNF阳性染色较老年对照强（图3-3）。海马各层IGF-1R, BDNF表达的相对水平见表3-6。分析光密度值，结果显示与青年鼠相比，老年对照组小鼠在除细胞层（DG、CA1和CA3的细胞层）之外的海马层IGF-1R水平较高，在DG颗粒细胞层，DG分子层，CA1椎体细胞层, CA3透明层和CA3椎体细胞层BDNF水平较低(*Ps*<0.05)。与老年对照组小鼠相比，HD-DNJ组小鼠在DG门区和CA1放射层IGF-1R水平较低，在DG颗粒细胞层，DG分子层，CA1椎体细胞层和CA3椎体细胞层BDNF水平较高（*Ps*<0.05）。与老年对照鼠相比，LD-DNJ组小鼠CA3起层IGF-1R水平较低，DG颗粒细胞层和CA1椎体细胞层BDNF水平较高(*Ps*<0.05)。分析HD-和LD-DNJ组小鼠IGF-1R和BDNF水平无明显差异(*Ps*<0.05)。性别、分组×性别的交互作用对海马各层蛋白水平无显著影响（*Ps*> 0.05）。

50



**图3-2. IGF-1R在不同分组SAMP8小鼠海马中的表达**

（A-E）分别代表老年对照组、青年对照组、阿卡波糖组、HD-DNJ组和LD-DNJ组小鼠海马

IGF-1R表达情况；图片均放大40倍；标尺= 400μm。

**Fig 3-2. The expression of the IGF-1R in hippocampus of SAMP8 mice**

(A-E) represent the expression of IGF-1R in the hippocampus in the old control group, young control group, acarbose group, HD-DNJ group and LD-DNJ group, respectively, each image under 40×magnificatio n. Scale bar = 400μm.

51



**图3-3. BDNF在不同分组SAMP8小鼠海马中的表达**

（A-E）分别代表老年对照组、青年对照组、阿卡波糖组、HD-DNJ组和LD-DNJ组小鼠海马BDNF

表达情况；图片均放大40倍；标尺= 400μm。

**Fig 3-3. The expression of the BDNF in hippocampus of SAMP8 mice**

(A-E) represent the expression of BDNF in the hippocampus in the old control group, young control group, acarbose group, HD-DNJ group and LD-DNJ group, respectively, each image under 40× magnification. Scale bar = 400μm.

52

安徽医科大学博士学位论文

表3-6. 各组小鼠海马不同亚层中的IGF-1R和BDNF相对含量(AOD值×100)

Tab 3-6.The relative levels of IGF-1 receptor and BDNF in different hippocampal sublayers indicated by AOD (× 100)

| 蛋白 | 分组 | DG |  |  | CA1 |  |  |  | CA3 |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | HI | GL | ML | ML | RL | PL | OL | ML | SL | PL | OL |
| IGF-1R | 老年对照 | 2.65±0.32 | 3.00±0.34 | 2.65±0.32 | 3.11±0.59 | 2.75±0.51 | 4.29±0.74 | 3.99±0.84 | 1.81±0.45 | 2.61±0.46 | 4.52±0.71 | 2.31±0.44 |
|  | 青年对照 | 0.99±0.41 \* | 1.59±0.74 | 1.06±0.39 \* | 1.31±0.33 \* | 0.47±0.19 \*\* | 2.67±0.57 | 0.84±0.31 \*\* | 0.61±0.11 \* | 1.22±0.19 \* | 3.87±0.66 | 1.09±0.22 \* |
|  | 阿卡波糖 | 1.68±0.38 \* | 2.02±0.33 | 1.63±0.42 \* | 2.75±0.41 | 1.29±0.37 \* | 3.86±0.58 | 2.34±0.41 | 1.42±0.38 | 2.10±0.42 | 3.32±0.41 \* | 1.32±0.37 |
|  | HD-DNJ | 1.48±0.41 \* | 2.09±0.45 | 2.04±0.45 | 2.41±0.46 | 1.32±0.40 \* | 3.71±0.61 | 2.46±0.47 | 1.12±0.30 | 1.76±0.41 | 3.28±0.61 | 1.46±0.26 |
|  | LD-DNJ | 1.82±0.62 | 2.29±0.68 | 1.86±0.50 | 2.26±0.52 | 1.75±0.46 | 4.26±0.59 | 2.51±0.54 | 1.31±0.55 | 1.81±0.39 | 3.93±0.59 | 1.28±0.38 \* |
| BDNF | 老年对照 | 3.04±0.34 | 2.26±0.40 | 2.55±0.36 | 3.88±0.54 | 3.16±0.52 | 3.24±0.41 | 2.23±0.34 | 2.52±0.45 | 3.64±0.44 | 4.77±0.56 | 3.35±0.48 |
|  | 青年对照 | 4.22±0.64 | 5.25±0.69 \*\* | 4.40±0.64 \* | 5.37±0.56 | 5.05±0.66 | 5.65±0.52 \*\* | 3.78±0.57 | 3.72±0.60 | 5.29±0.54 \* | 7.62±0.49 \*\* | 4.93±0.59 |
|  | 阿卡波糖 | 3. 51±0.52 | 4. 55±0.61 \* | 3. 80±0.61 | 4.49±0.60 | 3. 22±0.59 | 5.67±0.73 \* | 3.86±0.60 | 4.57±0.71 | 4.69±0.62 | 6.02±0.66 | 4.48±0.53 |
|  | HD-DNJ | 3.70±0.77 | 5.83±1.04 \*\* | 4.59±0.84 \* | 5.28±0.78 | 4.81±0.78 | 6.24±0.80 \*\* | 3.82±0.82 | 3.69±0.79 | 5.34±0.94 | 6.87±0.76 \* | 5.20±1.22 |
|  | LD-DNJ | 3.64±0.71 | 5.06±1.05 \* | 3.96±0.68 | 4.15±0.79 | 3.40±0.54 | 5.08±0.88 \* | 3.07±0.71 | 2.80±0.69 | 3.47±0.70 | 5.24±0.86 | 3.20±0.87 |

\*表示与老年对照组之间有显著性差异（*P* < 0.05）

53

#### 3.2.3 海马各层IGF-1R水平与记忆能力的相关性

海马各层IGF-1R水平与各认知任务成绩的相关性检测结果见表3-7。总体分析，海马大多数亚层的IGF-1R 水平与新物体再认PI10min (−0.468 ≤ *r* ≤ −0.326, *Ps* ≤

0.012)和位置再认PI10min (−0. 447≤*r*≤−0.292, *Ps*≤0.025)负相关。海马除各亚区细胞层之外的亚层均有IGF-1R水平与情景记忆PIo负相关(−0.523≤*r*≤−0. 322, *Ps* ≤

0.013)，DG门区IGF-1R水平与情景记忆PIod负相关(*r* =−0.421, *Ps* = 0.001)。

分组分析，对于老年对照组，DG细胞层，DG分子层和CA3椎体细胞层IGF-1R

水平与情景记忆PIo负相关(*r*=−0.671, −0.835, −0.757, *P*= 0.035, 0.003, 0.011); CA3

分子层IGF-1R水平与新物体再认PI10min负相关(*r* =−0.662, *P* = 0.037). 青年组小鼠

CA3分子层(*r* =−0.764, *P* = 0.004)和透明层IGF-1R水平(*r* =−0.690, *P* = 0.013)与情

景记忆PIod负相关。阿卡波糖组小鼠CA3-起层IGF-1R与新物体再认PI10min负相关（*r*

=−0.679, *P* = 0.040）。在HD-DNJ组，小鼠DG门区、分子层、CA1放射层IGF-1R水平与新物体再认PI10min、情景记忆PIo负相关(*Ps* <0.05)。在LD-DNJ组，小鼠CA1起层IGF-1R水平与MWM靶象限距离百分比、位置再认PI10min负相关，CA3细胞层

MWM靶象限距离百分比、新物体再认PI10min负相关(*Ps* <0.05)。

#### 3.2.4 海马各层BDNF水平与认知能力的相关性

相关性检测结果见表3-8。总体分析时，大多数海马层BDNF水平与MWM游泳路程负相关(−0.533≤*r*≤−0.321, *Ps*≤0.013)。CA1椎体细胞层BDNF水平与MWM靶象限距离百分比、新物体再认PI10min、情景记忆PIo正相关(*Ps* <0.05). DG分子层，

CA1放射层BDNF水平与位置再认PI10min正相关(*Ps* <0.05). CA3椎体细胞层BDNF

水平与情景记忆PIo正相关(*r* = 0.434, *P* = 0.001)。

分组分析时，对于老年对照组小鼠，CA3起层BDNF水平与MWM游泳路程负相关(*r* =−0.873, *P* = 0.001); CA3椎体细胞层BDNF水平与位置再认PI10min (*r* = 0.782, *P* = 0.008)、情景记忆PIo (*r* = 0.725, *P* = 0.018)正相关。阿卡波糖组小鼠CA3分子层BDNF水平小鼠与MWM游泳路程负相关(*r* =−0.743, *P* = 0.009). 在HD-DNJ组，小鼠DG细胞层BDNF水平与MWM靶象限距离百分比正相关(*r* = 0.909, *P* <0.001)。

54

LD-DNJ组小鼠DG细胞层BDNF水平与情景记忆PIo正相关(*r* = 0.681, *P* = 0.007)。

表3-7 小鼠海马各层IGF-1R与记忆能力的相关性

Table 3-7. Correlations between IGF-1R in each hippocampal layers and memory abilities

| 分组 | 海 马 亚层 | MWM |  | 新物体再认 | 位置再认 | 情景记忆 |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  | 目标象限路程百分比 | PI10min | PI10min | PIo | PIod |
|  |  | 平均路程 |  |  |  |  |
|  |  | r(P) | r(P) | r(P) | r(P) | r(P) | r(P) |
| 总体 | DG-HL | −.224(.088) | .196(.139) | −.385\*\*(.003) | −.292\*(.025) | −.322\*(.013) | −.421\*\*(.001) |
|  | DG-ML | −.087(.531) | .290(.150) | −.468\*\*(.000) | −.419\*\*(.001) | −.523\*\*(.000) | −.360(.065) |
|  | CA1-ML | .023(.886) | .204(.132) | −.219(.082) | −.215(.102) | −.517\*\*(.000) | −.241(.065) |
|  | CA1-RL | −.049(.703) | .264(.068) | −.355\*\*(.006) | −.371\*\*(.004) | −.415\*\*(.001) | −.132(.317) |
|  | CA1-OL | .141(.287) | .312(.121) | −.408\*\*(.001) | −.447\*\*(.000) | −.519\*\*(.000) | −.153(.247) |
|  | CA3-ML | .194(.141) | .230(.079) | −.326\*(.012) | −.126(.347) | −.347\*\*(.008) | −.119(.338) |
|  | CA3-SL | .157(.241) | .201(.130) | −.354\*\*(.006) | −.297\*(.023) | −.425\*\*(.000) | −.147(.160) |
|  | CA3-OL | −.187(.160) | −.186 (.163) | −.400\*\*(.002) | −.315\*(.016) | −.377\*\*(.003) | −.182(.108) |
| 老 年 对照 | DG-GL | .242(.531) | .044(.905) | .129(.712) | −.022(.960) | −.671\*(.035) | −.374(.287) |
| DG-ML | .530(.113) | .356(.313) | −.418(.229) | −.076(.820) | −.835\*\*(.003) | .145(.689) |
|  | CA3-ML | .444(.199) | .112(.758) | −.662\*(.037) | .155(.642) | −.132(.714) | .318(.370) |
|  | CA3-PL | .447(.195) | .481(.139) | −.172(.633) | −.353(.311) | −.757\*(.011) | .304(.394) |
| 青 年 对照 | CA3-ML | .346(.252) | −.105(.721) | .029(.929) | −.167(.588) | .501(.078) | −.764\*\*(.004) |
| CA3-SL | .065(.815) | −.605\*(.022) | .074(.809) | −.065(.835) | .447 (.119) | −.690\*(.013) |
| 阿 卡 波  糖 | CA3-OL | .150(.681) | .108(.783) | -.679\*(.040) | −.355(.329) | .203(.571) | .479(.192) |

55

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| HD-DNJ | DG-HL | .046(.887) | −.050(.877) | −.704\*(.011) | 250(.433) | −.594\*(.042) | −.195(.544) |
|  | DG-ML | −.242(.448) | .226(.479) | −.761\*\*(.004) | .241(.451) | −.582\*(.047) | .167(.604) |
|  | CA1-RL | −.338(.283) | −.156(.629) | −.714\*\*(.009) | −.096(.766) | −.654\*(.021) | .215(.502) |
| LD-DNJ | CA1-OL | −.330(.250) | −.542\*(.045) | .010(.972) | −.627\*(.016) | −.469(.091) | .470(.090) |
|  | CA3-PL | .476(.085) | −.778\*\*(.001) | -.611\*(.020) | −.110(.708) | .422(.133) | −.451(.105) |

\* *P*<0.05, \*\* *P*<0.01.

56

表3-8. 小鼠海马各层BDNF与记忆能力的相关性

Table 3-8. Correlations between BDNF in each hippocampal layers and memory abilities

| 分组 | 海马亚层 | MWM |  | 新 物 体 再认 | 位置再认 | 情景记忆 |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  | 目标象限路程百分比 | PI10min | PI10min | PIo | PIod |
|  |  | 平均路程 |  |  |  |  |
|  |  | r(P) | r(P) | r(P) | r(P) | r(P) | r(P) |
| 总体 | DG-GL | −.533\*\*(.000) | .094(.549) | .238(.084) | .113(.393) | .310\*(.019) | .161(.227) |
|  | DG-ML | −.495\*\*(.000) | .171(.303) | .133(.314) | .371\*\*(.004) | .250(.056) | .158(.228) |
|  | CA1-RL | −.460\*\*(.000) | .114(.378) | .160(.227) | .294\* (.022) | .232(.079) | .097(.491) |
|  | CA1-PL | −.433\*\*(.001) | .264\* (.044) | .332\*(.011) | .344(.079) | .436\*(.001) | .027(.845) |
|  | CA1-OL | −.528\*\*(.000) | .045(.717) | .199(.158) | .148(.213) | .303(.125) | .160(.227) |
|  | CA3-ML | −.434\*\*(.001) | .111(.390) | .220(.089) | .153(.206) | .236(.065) | .068(.611) |
|  | CA3-SL | −.358\*(.005) | .113(.381) | .200(.148) | .185(.182) | .230(.080) | .043(.747) |
|  | CA3-PL | −.451\*\*(.000) | .062(.664) | .207(.126) | .093 (.485) | .434\*\*(.001) | .230(.079) |
|  | CA3-OL | −.321\*(.013) | .081(.573) | .176(.186) | .175(.187) | .198(.144) | .091(.495) |
| 老 年 对照 | CA3-PL | −.561(.132) | −.237(.532) | −.145(.682) | .782\*(.008) | .725\*(.018) | −.172(.637) |
| CA3-OL | −.873\*\*(.001) | .038(.920) | .167(.642) | .375(.286) | .359(.308) | −.572(.084) |
| 阿 卡 波  糖 | CA3-ML | −.743\*\*(.009) | .116(.733) | .121(.726) | −.344(.300) | −.533(.091) | −.320(.366) |
| HD-DNJ | DG-GL | .353(.260) | .909\*\*(.000) | .325(.302) | .580(.048) | .201(.530) | .100(.756) |
| LD-DNJ | DG-GL | .096(.743) | .378(.182) | .185(.526) | .370(.193) | .681\*\*(.007) | −.080(.787) |

\* *P*<0.05, \*\* *P*<0.01.

57

### 3.3 长期服用阿卡波糖和DNJ对P8鼠Syt 1和Stx 1水平的影响

#### 3.3.1 海马各层Syt 1和Stx 1水平

光镜下观察Syt 1和Stx 1在小鼠海马所有亚区各层中均有表达。Syt 1主要以

DG门区，CA1放射层和起层免疫反应底物染色水平较深，Syt 1相对含量较高（图3-4）。Stx 1主要以DG门区，CA1放射层和CA3透明层表达水平较高（图3-5）。海马各层Syt 1和Stx 1水平见表3-9。老年对照鼠海马除DG门区以外的所有亚层

Syt1水平均显著高于青年对照组小鼠(*Ps*<0.05)。老年对照鼠DG门区, CA1放射层、细胞层和起层，CA3透明层的Stx 1水平明显较低于青年组（*Ps*<0.05）。性别、分组×性别的交互作用对海马各层蛋白水平无显著影响（*Ps*> 0.05）。

与老年对照鼠比较，阿卡波糖组小鼠在除DG门区之外的海马层Syt 1表达量较低，而CA3透明层和分子层Stx 1表达水平较高(*Ps* <0.05). HD-DNJ组小鼠在除DG门区之外的海马层Syt 1水平低于老年对照，DG门区，CA1放射层和CA3分子层Stx 1水平较高(*Ps*<0.05). LD-DNJ组小鼠在DG细胞层和分子层, CA1分子层和放射层, CA1起层和CA3透明层之外的海马层Syt 1水平明显较低，而DG门区Stx 1水平相对较高(*Ps*<0.05)。性别、分组×性别的交互作用对海马各层Syt 1和Stx 1蛋白水平无显著影响（*Ps*> 0.05）。

#### 3.3.2 海马各层Syt 1水平与认知能力的相关性

总体小鼠相关分析显示小鼠CA3分子层Syt 1水平与MWM游泳路程正相关(*r* = 0.255, *P* = 0.046). CA3透明层和分子层Syt 1水平与MWM靶象限游泳路程百分比成负相关(*Ps*≤0.05)。海马大多亚层的Syt 1水平与新物体再认PI10min负相关(−0.589≤*r*≤−0.285, *Ps*≤0.029)，与位置再认PI10min负相关(−0.510≤*r*≤−0.269, *Ps*≤0.039)。海马除DG门区外所有亚层Syt 1与情景记忆PIo(−0.630≤*r*≤−0.422, *Ps*≤0.001)和PIod(−0.482≤*r*≤−0.306, *Ps*≤0.017)负相关。分组分析时，对于青年对照组小鼠，CA3-分子层Syt 1水平与MWM目标象限游泳路程百分比负相关(*r* = −0.635, *P* =

0.026）. 阿卡波糖组小鼠DG分子层Syt 1水平与MWM游泳路程正相关（*r* = 0.694, *P* =

0.018)，与位置再认PI10min正相关(*r* =−0.673, *P* = 0.037). HD-DNJ组小鼠DG分子层、

58

CA1分子层Syt 1水平均与MWM目标象限路程百分比(*Ps*≤0.01)、与情景记忆PIod

呈负相关(*Ps*≤0.01)。LD-DNJ组小鼠DG分子层Syt 1水平与情景记忆PIo负相关（*r* =

−0.623, *P* = 0.017)、CA3透明层与位置再认PI10min负相关(*r* =−0.682, *P* = 0.007)，见表3-10.

#### 3.3.3 海马各层Stx 1水平与认知能力的相关性

总体小鼠相关分析显示小鼠海马CA1放射层Stx 1水平与情景记忆PIo (*r* = 0.329, *P* = 0.014) 和PIod (*r* = 0.287, *P* = 0.040) 正相关，CA3分子层Stx 1水平与情景记忆PIo正相关(*r* = 0.335, *P* = 0.014). CA1放射层和CA3椎体细胞层Stx 1水平与位置再认PI10min正相关(*r* = 0.296, *P* = 0.022; *r* = 0.314, *P* = 0.017). 除DG、CA1和CA3

的细胞层之外的海马各层Stx 1水平与新物体再认PI10min正相关（0.278≤*r*≤0.574，

*P*<0.033）。分组分析时，对于老年对照组小鼠，DG分子层Stx 1水平与MWM目标象限游泳路程百分比正相关(*r* = 0. 704, *P* = 0.029). CA3椎体细胞层Stx 1与位置再认PI10min正相关（*r* = 0. 837, *P* = 0.003）。青年组小鼠DG门区Stx 1水平与位置再认

PI10min正相关(*r* = 0.647, *P* = 0.035). 阿卡波糖组小鼠CA1椎体细胞层Stx 1水平与新物体再认PI10min正相关(*r* = 0.709, *P* = 0.014). HD-DNJ组小鼠CA1放射层Stx 1水平与位置再认PI10min、情景记忆PIo正相关(*r* = 0.623, *P* = 0.031; *r* = 0.763, *P* = 0.004)；

CA3分子层Stx 1水平与新物体再认PI10min正相关(*r* = 0.775, *P* = 0.003)，见表3-11.

59



**图3-4. Syt 1在不同分组SAMP8小鼠海马中的表达**

（A-E）分别代表老年对照组、青年对照组、阿卡波糖组、HD-DNJ组和LD-DNJ组小鼠海马Syt 1

表达情况；图片均放大40倍；标尺=400μm

**Fig 3-4. The expression of the Syt 1in hippocampus of SAMP8 mice**

(A-E) represent the expression of Syt 1 in the hippocampus in the old control group, young control group, acarbose group, HD-DNJ group and LD-DNJ group, respectively, each image under 40× magnification. Scale bar = 400μm.

60



**图3-5. Stx 1在不同分组SAMP8小鼠海马中的表达**

（A-E）分别代表老年对照组、青年对照组、阿卡波糖组、HD-DNJ组和LD-DNJ组小鼠海马Stx 1

表达情况；图片均放大40倍；标尺= 400μm

**Fig 3-5. The expression of the Stx 1 in hippocampus of SAMP8 mice**

(A-E) represent the expression of Stx 1 in the hippocampus in the old control group, young control group, acarbose group, HD-DNJ group and LD-DNJ group, respectively, each image under 40× magnification. Scale bar = 400μm.

61

安徽医科大学博士学位论文

表3-9 各组小鼠海马不同亚层中的Syt 1和Stx 1相对含量(AOD值×100)

Tab 3-9. The relative levels of Syt 1 and Stx 1 in different hippocampal sublayers indicated by AOD (× 100)

| 蛋白 | 分组 | DG |  |  | CA1 |  |  |  | CA3 |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | HI | GL | ML | ML | RL | PL | OL | ML | SL | PL | OL |
| Syt1 | 老年对照 | 7.03±1.78 | 1.32±0.42 | 3.53±0.92 | 3.16±0.91 | 6.65±1.32 | 2.15±0.51 | 6.30±1.27 | 4.24±0.86 | 4.92±0.74 | 2.58±0.71 | 5.30±1.03 |
|  | 青年对照 | 4.11±1.15 | 0.16±0.09\*\* | 0.95±0.15\*\* | 0.53±0.05\*\* | 1.07±0.31\*\* | 0.27±0.07\*\* | 1.06±0.23\*\* | 0.89±0.25\*\* | 1.08±0.26\*\* | 0.31±0.10\*\* | 1.29±0.27\*\* |
|  | 阿卡波糖 | 5.60±0. 91 | 0.14±0.08 \*\* | 2.28±0.36 \* | 0.63±0.01 \*\* | 1.52±0.54 \*\* | 0.39±0.11 \*\* | 1.93±0.42 \*\* | 1.01±0.35 \*\* | 1.44±0.36 \*\* | 0.55 ±0.11 \* | 1.42±0.38 \*\* |
|  | HD-DNJ | 4.53±0.92 | 0.17±0.06\* | 0.96±0.28\* | 0.58±0.26\* | 2.49±0.97\* | 0.50±0.16\* | 2.57±0.95\* | 1.05±0.43\* | 1.75±0.57\* | 0.68±0.21\* | 1.94±0.71\* |
|  | LD-DNJ | 6.92±1.01 | 0.49±0.10\* | 2.10±0.18\* | 1.64±0.36\* | 4.63±0.77 | 0.78±0.16\* | 5.03±0.80 | 1.88±0.40\* | 3.85±0.89 | 1.27±0.34\* | 3.70±0.48 |
| Stx1 | 老年对照 | 0.88±0.06 | 0.15±0.05 | 0.42±0.12 | 0.34 ±0.11 | 0.45±0.11 | 0.03±0.00 | 0.25±0.08 | 0.24±0.08 | 0.63±0.08 | 0.03±0.00 | 0.47±0.15 |
|  | 青年对照 | 1.76±0.14\* | 0.33±0.12 | 0. 57±0.19 | 0.68±0.18 | 1.40±0.22\*\* | 0.13±0.05\* | 0.67±0.19\* | 0.77±0.21\* | 1.17±0.21 | 0.05±0.01 | 0.75±0.20 |
|  | 阿卡波糖 | 0.89±0.07 | 0.11±0.01 | 0.56±0.05 | 0.54±0.13 | 0.57±0.08 | 0.04±0.02 | 0.36±0.09 | 0.55±0.12 \* | 1.33±0.10 \* | 0.03±0.02 | 0.59±0.12 |
|  | HD-DNJ | 1.41±0.19\* | 0.11±0.05 | 0.56±0.31 | 0.56±0.22 | 1.22±0.14\* | 0.06±0.02 | 0.34±0.13 | 0.56±0.10\* | 1.14 ±0.26 | 0.03±0.01 | 0.72±0.27 |
|  | LD-DNJ | 1.32±0.16\* | 0.07±0.01 | 0.32±0.09 | 0.37±0.14 | 0.66±0.09 | 0.04±0.01 | 0.22±0.16 | 0.28±0.08 | 0.75±0.14 | 0.02±0.01 | 0.52 ±0.04 |

\*表示与老年对照组之间有显著性差异（*P* < 0.05）

62

表3-10 小鼠海马各层Syt 1水平与记忆能力的相关性

Table 3-10. Correlations between Syt 1 in each hippocampal layers and memory abilities

| 分组 | 海马亚层 | MWM |  | 新物体再认 | 位置再认 | 情景记忆 |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  | 目标象限路程百分比 | PI10min | PI10min | PIo | PIod |
|  |  | 平均路程 |  |  |  |  |
|  |  | r(P) | r(P) | r(P) | r(P) | r(P) | r(P) |
| 总体 | DG-GL | .183(.161) | .039 (.766) | −.456\*\*(.000) | −.312(.016) | −.422\*\*(.001) | −.325\*(.011) |
|  | DG-ML | .180(.164) | .231(.078) | −.299\*(.021) | −.444\*\*(.000) | −.564\*\*(.000) | −.482\*\*(.000) |
|  | CA1-M  L | .246(.058) | .234(.075) | −.334\*\*(.010) | −.365\*\*(.004) | −.594\*\*(.000) | −.317\*(.013) |
|  | CA1-RL | .224(.107) | .217 (.099) | −.186(.159) | −.338\*\*(.009) | −.609\*\*(.000) | −.405\*\*(.002) |
|  | CA1-PL | .198(.140) | −.208(.113) | −.419\*\*(.001) | −.418\*\*(.001) | −.630\*\*(.000) | −.357\*\*(.005) |
|  | CA1-OL | .131(.235) | −.037(.858) | −.149(.261) | −.269\* (.039) | −.552\*\*(.000) | −.366\*\*(.004) |
|  | CA3-M  L | .255\*(.046) | .220(.094) | −.336\*\*(.009) | −.420\*\*(.001) | −.585\*\*(.000) | −.306\*(.017) |
|  | CA3-SL | .273(.061) | −.381\*\*(.003) | −.293\*(.024) | −.489\*\*(.000) | −.611\*\*(.000) | −.348\*\*(.008) |
|  | CA3-PL | .275(.059) | .158(.384) | −.285\*(.029) | −.510\*\*(.000) | −.586\*\*(.000) | −.312\*(.016) |
|  | CA3-OL | .287(.051) | −.323\*(.012) | −.589\*\*(.000) | −.355\*\*(.005) | −.580\*\*(.000) | −.355\*\*(.005) |
| 青年对照 | CA3-M L | −.331(.290) | −.635\*(.026) | −.089(.801) | .317(.372) | .103(.754) | −.121(.738) |
| 阿卡波糖 | DG-ML | .050(.899) | .368(.280) | −.317(.344) | −.631\*(.037) | .538(.086) | .527(.096) |
| CA3-OL | .694\*(.018) | −.361(.275) | .339(.305) | −.126(.711) | .376(.254) | −.044(.898) |
| HD-DN | DG-ML | .573(.052) | −.814\*\*(.001) | −.001(.997) | −.254(.426) | −.527(.079) | −.798\*\*(.002) |

63

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |  |  |  |
| J | CA1-M L | .536(.072) | −.747\*\*(.005) | ，291(.358) | .108(.737) | .216(.500) | −.855\*\*(.000) |
| LD-DNJ | DG-ML | −.066(.824) | −.333(.245) | .267(.357) | −.208(.475) | −.623\* (.017) | .408(.147) |
|  | CA3-SL | −.271(.349) | .062(.834) | .384(.175) | −.682\*\*(.007) | −.527(.053) | .260(.369) |

\* *P*<0.05, \*\* *P*<0.01.

表3-11 小鼠海马各层Stx 1水平与记忆能力的相关性

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 分组 | 海马亚层 | MWM |  | 新物体再认 | 位置再认 | 情景记忆 |  |
|  |  |  | 目标象限路程百分  比 | PI10min | PI10min | PIo | PIod |
|  |  | 平均路程 |  |  |  |  |
|  |  | *r*(*P*) | *r*(*P*) | *r*(*P*) | *r*(*P*) | *r*(*P*) | *r*(*P*) |
| 总体 | DG-HL | −.180(.167) | .158(.332) | .397\*\*(.002) | .232(.072) | .237(.146) | .147(.225) |
|  | DG-ML | −.139(.354) | .104(.452) | 574\*\*(.000) | .086(.531) | .229(.159) | .180(.228) |
|  | CA1-ML | −.086(.539) | .006(.977) | .524\*\*(.000) | .079(.564) | .147(.277) | .144(.219) |
|  | CA1-RL | −.217(.103) | .025(.924) | .572\*\*(.000) | .296\*(.022) | .329\*(.014) | .287\*(.040) |
|  | CA1-OL | −.115(.449) | −.042(.859) | .299\*(.021) | 147(.246) | .176(.257) | .245(.062) |
|  | CA3-ML | −.136(.391) | .089(.529) | .278\*(.033) | .172(.190) | .335\*(.014) | .148(.212) |
|  | CA3-PL | −.083(.549) | −.151(.215) | .151(.206) | .314\*(.017) | .201(.116) | .243(.062) |
|  | CA3-OL | −.080(.560) | .110(.303) | .310\*(.018) | −.080(.581) | .156(.281) | .037(.788) |
| 老年对照 | DG-ML | .134(.738) | .704\*(.029) | .405(.247) | .277(.459) | .110(.758) | .326(.357) |
| CA3-PL | .169(.638) | −.474(.165) | .072(.842) | .837\*\*(.003) | .434(.209) | .072(.843) |
| 青年对照 | DG-HL | −.290(.379) | −.091(.777) | .126(.687) | .647\*(.035) | −.030(.931) | .173(.613) |

Table 3-11. Correlations between Stx 1 in each hippocampal layers and memory abilities

64

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 阿卡波糖 | CA1-PL | .392(.258) | −.579(.070) | .709\*(.014) | −.030(.937) | −.187(.629) | −.576(.063) |  |
| HD-DNJ | CA1-RL | .444(.149) | .328(.298) | −.325(.303) | .623\* (.031) | .763\*\*(.004) | −.168(.601) |  |
|  | CA3-ML | .029(.928) | .041(.900) | .775\*\*(.003) | .158(.624) | .546(.066) | −.011(.973) |  |
| LD-DNJ | CA1-RL | .210(.472) | −.111(.707) | 0.034(.907) | −.610\*(.021) | .309(.283) | .133(.650) |  |

\* *P*<0.05, \*\* *P*<0.01.

### 3.4 阿卡波糖和DNJ对P8鼠星形胶质细胞活化状态的影响

#### 3.4.1 海马各层GFAP水平

海马不同亚层GFAP染色情况见图3-6，表达相对水平见表3-12。与青年鼠相比，老年对照组小鼠海马内GFAP阳性细胞形态增大，突起增粗，GFAP免疫反应染色较深。分析AOD值发现，各组小鼠海马DG区（颗粒细胞层、门区和分子层）、

CA1（分子层、放射层、细胞层、起层）、CA3（分子层、透明层、起层）的GFAP水平存在显著差异。老年对照鼠在海马DG区各层、CA1分子层、放射层、细胞层、CA3分子层、透明层、起层的GFAP水平较青年对照组小鼠高。与老年对照相比，阿卡波糖组小鼠DG颗粒细胞层和分子层、CA1各层、CA3分子层的GFAP水平较低(*Ps*<0.05); HD-DNJ组小鼠DG区各层、CA1各层、CA3分子层、透明层、起层的GFAP水平较低(*Ps*<0.05); LD-DNJ组小鼠DG颗粒细胞层、DG分子层、CA1各层、CA3分子层和起层中GFAP水平较低(*Ps*<0.05). HD-和LD-DNJ组小鼠GFAP 水平无显著差异(*P* <0.05)。

#### 3.4.2 海马各层GFAP水平与学习记忆能力的相关性

相关性检测结果见表3-13. 总体分析时，海马DG分子层和CA1细胞层GFAP水平与MWM靶象限距离百分比负相关(*r* =−0.320, *P* = 0.012; *r* =−0.489, *P* <0.001)。

DG门区、CA1分子层、放射层、细胞层、CA3分子层GFAP水平与新物体再认PI10min负相关(−0.373≤*r*≤−0.262, *Ps*≤0.038)。CA1分子层、细胞层、CA3起层GFAP水平与位置再认PI10min负相关(*Ps* <0.05)。大多海马层（除CA1起层和CA3细胞层以外）

GFAP水平与情景记忆PIo (−0.517≤*r*≤−0.266, *Ps*≤0.035)、PIod (−0.588≤*r* ≤

65

−0.301, *Ps*≤0.016）负相关。分组分析时，对于老年对照组小鼠，DG门区GFAP水平与MWM靶象限距离百分比负相关(*r* =−0.600, *P* = 0.039)； CA3起层GFAP水平与

MWM平均路程正相关(*r* = 0.689, *P* = 0.013). 阿卡波糖组小鼠CA1分子层GFAP水平小鼠与MWM靶象限距离百分比负相关(*r* =−0.690, *P* = 0.010). 在HD-DNJ组，小鼠

DG分子层、CA1放射层GFAP水平与MWM靶象限距离百分比负相关；CA1放射层、

CA3起层GFAP与位置再认PI10min负相关；DG分子层GFAP与情景记忆PIod负相关(*Ps* <0.05). LD-DNJ组小鼠DG分子层GFAP水平与MWM游泳距离正相关，与情景记忆PIo负相关(*Ps* <0.05)。

66

表3-12 各组小鼠海马不同亚层中的GFAP相对含量(AOD值×100)

Tab 3-12.The relative levels of GFAP in different hippocampal sublayers indicated by AOD of immunohistochemical staining (× 100)

| 分组 | DG |  |  | CA1 |  |  |  | CA3 |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | HI | GL | ML | ML | RL | PL | OL | ML | SL | PL | OL |
| 老年对照 | 2.72±0.60 | 1.47±0.37 | 2.30±0.33 | 3.54±0.58 | 2.01±0.46 | 1.34±0.38 | 1.95±0.24 | 1.92±0.49 | 1.37±0.30 | 0.35±0.06 | 2.09±0.50 |
| 青年对照 | 1.12±0.39 \* | 0.48±0.13\* | 0.59±0.22\*\* | 1.46±0.55\* | 0.92±0.20\* | 0.25±0.05 | 1.31±0.32\* | 0.78±0.20\* | 0.50±0.14\* | 0.25±0.05 | 0.69±0.10\*\* |
| 阿卡波糖 | 1.22±0.37 \* | 1.05±0.36 | 1.23±0.44 \* | 1.39±0.49 \*\* | 0.83±0.24 \*\* | 0.79±0.29 \* | 1.06±0.34 \* | 0.87±0.32 \*\* | 0.72±0.25 | 0.19±0.05 | 1.25±0.05 |
| HD-DNJ | 1.31±0.17\* | 0.76±0.12\* | 0.86±0.11\*\* | 0.93±0.15\*\* | 1.13±0.15\* | 0.49±0.10\*\* | 0.99±0.12\* | 0.70±0.17\* | 0.62±0.14\* | 0.39±0.10 | 0.54±0.09\*\* |
| LD-DNJ | 1.14±0.10\* | 1.15±0.10 | 1.02±0.18\* | 0.90±0.13\*\* | 0.98±0.12\* | 0.29±0.06\*\* | 1.12±0.17\* | 0.79±0.10\* | 0.65±0.17 | 0.41±0.08 | 1.00±0.19\* |

\*表示与老年对照组之间有显著性差异（*P* < 0.05）

67



**图3-6** **GFAP在不同分组SAMP8小鼠海马中的表达**图片均放大200倍；标尺= 100μm

**Fig 3-6. The expression of the GFAP in hippocampus of SAMP8 mice**

Each image under 200×magnification. Scale bar = 100μm.

68

表3-13 小鼠海马各层GFAP水平与记忆能力的相关性

Table 3-13. Correlations between GFAP in each hippocampal layers and memory abilities

| 分组 海马亚 | MWM |  | 新物体再认 | 位置再认 | 情景记忆 |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 层 | 平均路程 | 目标象限路 | PI10min | PI10min | PIo | PIod |
|  |  | 程百分比 |  |  |  |  |
|  | r(P) | r(P) | r(P) | r(P) | r(P) | r(P) |
| 总 体 DG-HL | −.042(.785) | .194(.171) | −.262\*(.038) | −.098(.445) | −.309\*(.014) | −.375\*\*(.002) |
| DG-GL | .153(.234) | −.012(.923) | −.146(.253) | −.131(.305) | −.266\*(.035) | −.485\*\*(.000) |
| DG-ML | .185(.128) | −.320\*(.012) | −.203(.110) | −.077(.550) | −.363\*\*(.003) | −.545\*\*(.000) |
| CA1-ML | .014(.922) | .104(.418) | −.262\*(.038) | −.320\*(.012) | −.362\*\*(.004) | −.464\*\*(.000) |
| CA1-RL | .135(.241) | .032(.803) | −.264\*(.036) | −.210(.108) | −.341\*\*(.006) | −.308\*(.014) |
| CA1-PL | .034(.789) | −.489\*\*(.000) | −.373\*\*(.002) | −.325\*(.011) | −.399\*\*(.001) | −.470\*\*(.000) |
| CA3-ML | .061(.634) | .135(.265) | −.279\*(.028) | −.111(.364) | −.412\*\*(.000) | −.442\*\*(.000) |
| CA3-SL | .170(.183) | .159(.214) | −.222(.143) | −.245(.105) | −.517\*\*(.000) | −.301\*(.016) |
| CA3-OL | .205(.114) | .086(.503) | −.229(.099) | −.256\* (.041) | −.360\*(.005) | −.588\*\*(.000) |
| 老 年 DG-HL | .081(.802) | −.600\*(.039) | −.166 (.193) | .128(.691) | −.135(.677) | −.249(.435) |
| 对 照 CA3-OL | .689\*(.013) | −.517(.085) | .118(.716) | .398(.200) | .060(.853) | −.685\*(.014) |
| 阿 卡 CA1- |  |  |  |  |  |  |
| 波 糖 ML | −.316(.298) | −.690\*\*(.010) | .419(.156) | .382(.202) | .085(.793) | .436(.141) |
| HD-D DG-ML | −.484(.157) | −.707\*(.022) | .630(.051) | −.084(.818) | .268(.454) | −.783\*(.002) |
| NJ CA1-RL | −.071(.846) | −.717\*\*(.006) | .168(.643) | −.840\*\*(.002) | −.202(.576) | .006(.987) |
| CA3-OL | .009(.981) | .196(.588) | .482(.159) | −.777\*(.002) | −.190(.599) | .095(.794) |

LD-D DG-ML

NJ

.608\*(.036).539(.071).156(.627).169(.599).196(.542).582\*(.047)

\* *P*<0.05, \*\* *P*<0.01.

69

### 3.5 长期口服阿卡波糖和DNJ对P8鼠组蛋白乙酰化修饰的影响

#### 3.5.1 海马各层H3K9乙酰化水平

各海马细胞层可见H3K9乙酰化阳性染色。分析结果显示各组小鼠DG颗粒细胞层、CA1区和CA3区的椎体细胞层H3K9乙酰化水平存在显著差异[*F*(4,58) = 3.099, *P* = 0.023; *F*(4,58) = 4.896, *P* = 0.002; *F*(4,58) = 7.119, *P*<0.001]. 性别、分组×性别的

交互作用对H3K9乙酰化无显著影响(*Ps*> 0.05). 分析组间差异发现，老年对照组小鼠DG、CA1和CA3细胞层乙酰化H3K9水平显著低于青年鼠（*P* = 0.006, *P* = 0.001, *P*<0.001）. 阿卡波糖组小鼠DG、CA1和CA3细胞层乙酰化H3K9水平显著高于老年对照(*P* = 0.042, 0.049, 0.005). HD-DNJ组小鼠DG、CA1和CA3细胞层的乙酰化H3K9水平也显著高于老年对照(*P* = 0.049, 0.003, 0.001). LD-DNJ组小鼠仅CA1细胞层乙酰化H3K9水平显著高于老年对照(*P* = 0.014). HD-DNJ组小鼠

CA3细胞层乙酰化H4K8水平明显高于LD-DNJ组小鼠(*P* = 0.026)，见表4-1.

#### 3.5.2 海马各层H4K8乙酰化水平

乙酰化H4K8的阳性表达见于海马细胞层。方差分析结果提示各组小鼠DG颗粒细胞层、CA1区和CA3区的椎体细胞层的乙酰化H4K8水平存在显著差异[*F*(4,58) = 39.091, 45.722, 24.853, *Ps*<0.001]。性别、分组×性别的交互作用对乙酰化H4K8水平无显著影响(*Ps*> 0.05). Dunnett检验结果显示，老年对照组小鼠DG、CA1和CA3细胞层的乙酰化H4K8水平显著低于青年鼠（*Ps*<0.001）。阿卡波糖组小鼠海马各细胞层乙酰化H4K8水平显著于老年对照(*Ps*<0.001). HD-DNJ也提高了海马各细胞层的乙酰化H4K8水平（*Ps*<0.001），而LD-DNJ组小鼠仅CA1-PL乙酰化H4K8水平高于老年对照(*P* = 0.007). HD-DNJ组小鼠三层乙酰化H4K8水平明显高于LD-DNJ组小鼠(*Ps*<0.001)，见表4-1。

70



**图3-7** **乙酰化H3K9在不同分组SAMP8小鼠海马中的表达**

（A-E）分别代表老年对照组、青年对照组、阿卡波糖组、HD-DNJ组和LD-DNJ组小鼠海马乙酰化H3K9表达情况；图片均放大40倍；标尺= 400μm。

**Fig 3-7. The level of the histone H3 acetyl K9 in hippocampus of SAMP8 mice**

(A-E) represent the level of the histone H3 acetyl K9 in the hippocampus in the old control group, young control group, acarbose group, HD-DNJ group and LD-DNJ group, respectively, each image under 40× magnification. Scale bar = 400μm.

71



**图3-8**  **乙酰化H4K8在不同分组SAMP8小鼠海马中的表达**

（A-E）分别代表老年对照组、青年对照组、阿卡波糖组、HD-DNJ组和LD-DNJ组小鼠海马乙酰化H4K8表达情况；图片均放大40倍；标尺= 400μm。

**Fig 3-8. The level of the histone H4 acetyl K8 in hippocampus of SAMP8 mice**

(A-E) represent the level of the histone H4 acetyl K8 in the hippocampus in the old control group, young control group, acarbose group, HD-DNJ group and LD-DNJ group, respectively, each image under 40× magnification. Scale bar = 400μm.

72

表3-13 各组小鼠海马细胞层的H3K9和H4K8乙酰化水平

Tab 3-13. The relative levels of histone H3 acetyl K9 and H4 acetyl K8 in different

Hippocampal subregions

| 蛋白 | 分组 | DG-GL | CA1 -PL | CA3- PL |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| H3K9 乙酰化 | 老年对照组 | 3.07 ±0.17 | 3.15 ±0.19 | 3.08 ±0.17 |
|  | 青年对照组 | 4.24 ±0.34\*\* | 4.28 ±0.33\*\* | 4.18 ±0.31\*\* |
|  | 阿卡波糖组 | 3.99 ±0.23\* | 3.85 ±0.17\* | 4.00 ±0.21\*\* |
|  | HD-DNJ | 3.94 ±0.16\* | 4.14 ±0.16\*\* | 4.20 ±0.16\*\* |
|  | LD-DNJ | 3.72 ±0.31 | 3.96 ±0.12\* | 3.37 ±0.11\* |
| H4K8 乙酰化 | 老年对照组 | 2.10±0.10 | 1.79±0.09 | 1.48±0.14 |
|  | 青年对照组 | 3.80±0.09\*\* | 2.86±0.10\*\* | 2.75±0.10\*\* |
|  | 阿卡波糖组 | 2.85±0.20 \*\* | 2.38±0.07 \*\* | 2.18±0.12 \*\* |
|  | HD-DNJ | 3.19±0.09\*\* | 2.65±0.08 \*\* | 2.62±0.13 \*\* |
|  | LD-DNJ | 2.12±0.08 | 2.08±0.05\* | 1.66±0.07 |

\* *P*<0.05, \*\* *P*<0.01.

3.5.3海马各层H3K9乙酰化水平与记忆能力的相关性

总体小鼠相关分析显示小鼠DG、CA1和CA3细胞层H3K9乙酰化水平与位置再认PI10min(*r* = 0.360, 0.410, 0.460, *Ps*≤0.01)、情景记忆PIod (*r* = 0.392, 0.426, 0.386,

*Ps*≤0.01）正相关。CA1和CA3椎体细胞层H3K9乙酰化水平与情景记忆PIo正相关（*r*

= 0. 298, 0.282, *Ps* = 0.05）。分组分析时，阿卡波糖组小鼠，CA1和CA3椎体细胞

层H3K9乙酰化水平与位置再认PI10min正相关(*r* = 0.662, 0.846, *P* = 0.019, 0.001). HD-DNJ组小鼠CA1细胞层H3K9乙酰化水平与MWM靶象限路程百分比、情景记忆

PIo正相关(*r* = 0.788, *P* = 0.001; *r* = 0.728, *P* = 0.005). LD-DNJ组小鼠CA1细胞层

H3K9乙酰化水平与情景记忆PIod正相关(*r* = 0.559, *P* = 0.038)，见表4-2.

73

3.5.4海马各层H4K8乙酰化水平与记忆能力的相关性

总体小鼠相关分析显示小鼠DG、CA1和CA3细胞层H4K8乙酰化水平与MWM游泳路程负相关(*r* =−0.339, −0.299, −0.395, *Ps*≤0.05)，与位置再认PI10min (*r* = 0.356,

0.435, 0.371, *Ps*≤0.01)、情景记忆PIo (*r* = 0.356, 0.435, 0.371, *Ps*≤0.001)和PIod (*r*

= 0.415, 0.480, 0.328, *Ps*≤0.01)正相关。CA3椎体细胞层H4K8乙酰化水平与新物体再认PI10min正相关(*r* = 0.271, *P* = 0.032). 分组分析时，老年对照海马CA1椎体细胞层H4K8乙酰化水平与情景记忆PIo正相关(*r* = 0.679, *P* = 0.015). HD-DNJ组CA3椎体细胞层H4K8乙酰化水平与新物体再认PI10min正相关(*r* = 0.651, *P* = 0.016). LD-DNJ组小鼠CA1椎体细胞层H4K8乙酰化水平与MWM路程负相关(*r* =−0.618, *P*

= 0.018)，见表4-2.

表3-14 小鼠海马各层H3K9和H4K8乙酰化水平与记忆能力的相关性

Table 3-14. Correlations between the levels of H3K9ac and H4K8ac in the hippocampal layers and memory abilities

|  | 分组 | 海马亚层 | MWM |  | 新物体再认 | 位置再认 | 情景记忆 |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  | 平均路程 | 靶象限路程百分比 | PI10min | PI10min | PIo | PIod |
|  |  |  | R (P) | R (P) | R (P) | R (P) | R (P) | R (P) |
| H3K9  乙酰化 | 总体 | DG-GL | −.095(.458) | .202(.874) | .169(.186) | .360\*\*(.004) | .182(.154) | .392\*\*(.001) |
|  | CA1-PL | −.011(.933) | .094(461) | .124(.333) | .410\*\*(.001) | .298\*(.018) | .426\*\*(.000) |
|  |  | CA3-PL | −.060(.643) | .238(.060) | .120(.347) | .460\*\*(.000) | .282\*(.025) | .386\*\*(.002) |
|  | 阿 卡 波  糖 | CA1-PL | .356(.256) | −.459(.133) | .398(.200) | .662\* (.019) | −.153(.636) | −.463(.129) |
|  | CA3-PL | .212(.509) | −.249(.434) | .021(.949) | .846\*\*(.001) | .340(.280) | −.167(.605) |

74

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | HD-DNJ | CA1-PL | .031(.919) | .788\*\*(.001) | .434 (.138) | .728\*\*(.005) | .377(.204) | .096(.756) |
|  | LD-DNJ | CA1- PL | .371(.192) | .164(.576) | .022(.941) | −.065(.824) | −.015 (.958) | .559\* (.038) |
| H4K8  乙酰化 | 总体 | DG-GL | −.339\*\*(.007) | .229(.071) | .141(.270) | .356\*\*(.004) | .431\*\*(.000) | .415\*\*(.001) |
|  | CA1-PL | −.299\*(.017) | .222(.080) | .230(.070) | .435\*\*(.000) | .583\*\*(.000) | .480\*\*(.000) |
|  |  | CA3-PL | −.395\*\*(.001) | .068(.595) | .271\*(.032) | .371\*\*(.003) | .509\*\*(.000) | .328\*\*(.009) |
|  | 老 年 对  照 | CA1-PL | .119(.713) | .095 (.768) | −.087(.789) | .434(.158) | .679\*(.015) | .396(.203) |
|  | HD-DNJ | CA3-PL | −.254(.403) | −.256(.398) | .651\*( .016) | −.119(.698) | .479(.098) | −.092(.765) |
|  | LD-DNJ | CA1-PL | −.618\*(.018) | −.283(.327) | .114(.698) | .144(.624) | −.394(.163) | .358(.209) |

\* *P*<0.05, \*\* *P*<0.01.

## 4. 讨论

### 4.1 阿卡波糖和DNJ缓解衰老相关胰岛素系统改变

在本实验中，我们采用了ELISA检测了血糖、血胰岛素水平，结果显示老年对照小鼠和青年对照小鼠的血糖水平没有明显差异。老年对照组小鼠血胰岛素水平比青年对照较低。既往关于衰老对胰岛素系统影响的临床研究发现，衰老是糖尿病的危险因素[165]。老年糖尿病患者胰岛的胰岛素分泌功能以及胰岛素靶器官对胰岛素的敏感性均随着年龄增长而下降[166]。不仅如此，在糖耐量正常的老年人也同样存在这种胰岛素分泌和功能异常并且随衰老加重[167]。胰岛素水平受多种因素影响，包括饮食习惯、肥胖程度、健康状况、常见的胰岛素拮抗激素（胰高血糖素，生长激素，皮质醇等）的水平[168]。因此，动物实验中年龄对血胰岛素水平的影响存在不同结果，例如，研究报道不同年龄段Wistar大鼠空腹胰岛素水平并无差异[165]，也有研究观察到老年小鼠显示出空腹或非空腹胰岛素水平升高，可能是胰岛素抵抗的代偿性反应[169, 170]。较为一致的发现是，老年啮齿类动物的血浆和胰

75

岛测定的葡萄糖诱导的胰岛素分泌降低[165, 170]。随着衰老进程，胰岛β细胞分泌功能逐渐下降[171]。研究发现其机制可能涉及K+通道和Ca2+通道功能异常[172]、胰岛素基因表达降低和葡萄糖转运体-2 mRNA减少等[171]。

本研究中，老年对照组小鼠血胰岛素水平较低原因不明确。由于P8小鼠是一个具有加速衰老表现的模型，老年对照鼠血胰岛素水平降低可能是胰岛β细胞随着衰老胰岛素分泌功能受损的结果。对于脑胰岛素来源的研究发现，体外培养的神经元、发育期的边缘系统和嗅觉区域有胰岛素合成，但是成人大脑中没有发现胰岛素合成[20]。目前认为脑内胰岛素水平基本依赖于外周胰岛素跨血脑屏障转运入脑[173]。因此，老年P8鼠血胰岛素水平降低可能导致从外周转运至中枢神经系统的胰岛素减少。

对于InsR水平，本实验结果显示了老年P8鼠海马各层InsR减少。有相似的研究观察到老年脑内海马、皮质、脉络丛InsR减少[14]。经链脲霉素处理的APP/PS1转基因小鼠，血胰岛素水平低下，且与认知损害密切相关[174]。此外，患有衰老相关神经退行性疾病（包括AD或帕金森病）的患者也有脑内InsR免疫染色水平降低，并且伴随中枢胰岛素信号降低[175]。血胰岛素缺乏，胰岛素抵抗和脑中InsR的免疫反应性降低可能共同参与了AD的发病机制[174, 175]。

相关性分析结果显示血胰岛素和海马胰岛素水平与MWM和NLR的空间记忆能力、新物体再认、情景记忆能力呈正相关性，提示胰岛素及胰岛素信号对SAMP8鼠记忆系统的多个方面都有保护作用。经鼻给予胰岛素能够增强脑胰岛素信号，不仅可以改善AD患者的认知功能，还能有效提高认知正常个体的学习和记忆能力[48, 176]。正常老年人高胰岛素水平与全面认知下降密切相关，而早期AD患者，高胰岛素水平与较轻的认知下降和全脑萎缩有关，提示胰岛素抵抗参与了正常老年人的认知减退，而早期AD患者高胰岛素水平对脑组织有保护作用[177]。然而，有研究报道了神经元特异性InsR敲除小鼠，其Akt和糖原合酶激酶3的活性改变，

tau蛋白的过度磷酸化，然而并没有记忆障碍[178]。该研究提示了胰岛素可能与其他信号通路相互作用，胰岛素信号在大脑老化的保护作用可能比表面上看来更复杂。

阿卡波糖用于糖尿病和糖耐量异常病人的降血糖治疗已有二十多年历史，服

76

用方便，适合长期使用[80]。阿卡波糖不仅直接抑制食物中糖吸收入血，还间接调控全天糖代谢，对胰岛素分泌功能的调整有保护作用[80]。

本实验中，长期服用阿卡波糖对血糖水平无显著影响，增加了老年P8鼠血胰岛素水平。在Harrison等研究者的报道中，从4月龄开始持续喂养阿卡波糖1000 mg/kg diet (1000 ppm)八个月，导致小鼠体重较轻、血胰岛素水平降低，平均寿命和最长寿命均较对照延长[109]。我们的结果与Harrison的结果不一致，原因可能是我们所使用的小鼠鼠种不同，采用的阿卡波糖剂量不同，在停药1.5月后采集血标本进行了检测，采集前未对P8鼠进行禁食处理。作为α-葡萄糖苷酶抑制剂，阿卡波糖通过减少胃肠道吸收的葡萄糖量降低餐后血糖水平，同时糖代谢所需胰岛素减少，因此也缓解了胰岛素抵抗[80]。有研究发现在糖尿病后期，阿卡波糖可以缓解胰岛β细胞应激损伤，提高胰岛素合成和分泌的效率[179]。本实验中，阿卡波糖缓解衰老相关胰岛素水平降低的机制不明，可能是通过影响衰老相关胰岛β细胞功能。

本实验中，DNJ的效应和阿卡波糖类似，HD-和LD-DNJ均增加了老年P8鼠血胰岛素水平，但是对血糖无显著影响。DNJ是α-葡萄糖苷酶强力抑制剂，与阿卡波糖降糖机制相同。在人类研究和高血糖或糖尿病啮齿类动物模型，DNJ可以减少小肠单糖吸收和减少血糖水平[85, 87, 180]。DNJ还可通过升高脂联素和糖转运体

4（GLUT4）的活性发挥降血糖的作用[181]。长期口服DNJ的2型糖尿病模型大鼠的体重降低，胰岛素敏感性升高[87]。此外，DNJ有益于胰岛素分泌功能，例如DNJ和桑叶多糖混合物可以调节老年C57BL/6小鼠的肝糖代谢，上调胰岛胰岛素基因表达[180]。本研究中，DNJ减轻血胰岛素水平衰老相关减少，可能与DNJ提高胰岛素敏感性和缓解胰岛压力的功能有关。

对于海马InsR水平，阿卡波糖组小鼠海马InsR水平较老年对照高，表明长期服用阿卡波糖缓解了衰老相关的InsR水平降低。HD-和LD-DNJ也增加了老年P8鼠大多数海马层的InsR水平。阿卡波糖和DNJ影响海马InsR水平的具体机制不明，表观遗传学改变可能参与其中。相关分析数据提示胰岛素信号对老年P8鼠学习和记忆能力有保护作用。阿卡波糖和DNJ通过缓解了衰老相关的InsR水平降低，

77

可能提高了中枢胰岛素信号，参与了对老年P8鼠认知功能的改善作用。

### 4.2 阿卡波糖和DNJ缓解衰老相关IGF-1R和BDNF水平改变

IGF-1 是一种重要的神经营养激素，其结构和功能与胰岛素同源[139]。IGF-1

与IGF-1R 或胰岛素受体结合后， 激活与胰岛素信号相似的信号通路。其中，

PI3K/Akt信号激活促进神经元糖代谢、抗凋亡、抗氧化相关的蛋白的合成，MAPK信号通路促进神经突起生长和神经元生存相关的基因表达[175]。目前研究发现IGF-1信号对长时程增强，记忆形成和巩固发挥重要作用[182]。中枢和外周血IGF-I水平或IGF-1信号随衰老而下降，与认知功能下降密切相关，可能是导致衰老相关认知损害的原因之一[140]，给予外源性IGF-1可以缓解认知功能损害[59]。减少血管性痴呆和AD的发病率[58, 183]。

本实验中，血清学检测显示年龄和阿卡波糖对血清中IGF-1水平无显著影响，尽管如此，DNJ组小鼠的血清IGF-1水平较老年对照组小鼠有显著升高。我们采用免疫组织化学法检测小鼠海马不同亚区层IGF-1R表达情况，结果发现，老年鼠海马多个亚层IGF-1R水平较青年对照升高，而阿卡波糖和DNJ均可以缓解衰老相关的IGF-1R水平升高。高剂量DNJ比低剂量DNJ效果更显著。

有研究发现老年Sprague–Dawley大鼠皮质区椎体细胞和海马CA3区IGF-1R水平随衰老而升高[184]。转基因AD小鼠大脑皮质和海马中的IGF-1R水平较高[185]。在正常衰老小鼠脑内，IGF-1R水平升高与IGF-1-PI3K/Akt信号显著降低有关[140]，提示海马IGF-1R水平升高可能是IGF-1/胰岛素抵抗的代偿反应。老年人类和啮齿类动物的中枢IGF-I信号降低参与了学习记忆成绩的下降[80, 186]。在本实验相关分析结果中，海马IGF-1R水平与学习记忆能力的显著相关性提示了IGF-1R水平升高可能与衰老相关学习记忆能力下降有关。阿卡波糖和DNJ降低了老年P8鼠海马IGF-1R水平机制不明，可能是通过减轻IGF-1/胰岛素抵抗。阿卡波糖和DNJ可能通过升高血清中胰岛素和海马胰岛素受体水平，促进了胰岛素/IGF-1信号，从而改善了老年鼠认知能力。然而，有研究报道了抑制的IGF-1信号能够延长寿命，其机制可能涉及胰岛素敏感性增加[57]。在热卡限制的模型，也发现了IGF-1信号

78

降低参与了寿命延长[187]。因此，IGF-1信号在脑衰老中的角色比较复杂，不能简单定义为有益或有害，有待进一步研究。

BDNF是广泛分布于脑组织的一个重要的多功能神经营养因子，尤其在海马、皮质、基底前脑分布较密集。BDNF参与调节能量代谢，神经元的生存和可塑性，并且在调节突触可塑性和神经生长上具有重要作用[138]。BDNF通过激活MAPK、

Akt和PKMδ等信号通路，促进细胞骨架改变和突触前蛋白的合成，从而促进LTP

[188]. 血清中BDNF主要由外周单核细胞和内皮细胞分泌，能够轻松穿透血脑屏障，其水平可以被脑内BDNF水平影响[189]。实验室啮齿类动物在正常衰老过程中外周血循环和大脑表达的BDNF均减少[141]。

在本实验中，血清学结果显示老年鼠血BDNF水平较青年没有变化，阿卡波糖对血BDNF水平亦无显著影响，但是长期服用DNJ的小鼠血BDNF浓度升高。海马免疫组化结果显示在海马DG 区细胞层和分子层，CA1 区反射层和细胞层

CA3区透明层和细胞层BDNF表达量降低。阿卡波糖缓解了海马DG细胞层和CA1细胞层BDNF水平的下降，HD-和LD-DNJ也缓解了衰老相关海马BDNF水平下降，且高剂量效果较显著。相关性分析提示海马BDNF含量降低与记忆能力损害有相关性，尤其是与MWM空间学习成绩和情景记忆能力损害关系密切。

已有研究发现在正常衰老和神经变性疾病脑内，特别是海马神经元内BDNF低表达与LTP减少和认知功能异常有关[190, 191]。衰老相关BDNF降低与衰老相关海马容量降低和海马依赖的学习记忆减退有关[141]。TrkB 激动剂治疗能够增强

BDNF信号， 修复老年动物海马LTP[192]。

有相似研究发现绿茶儿茶酚能够增加C57BL/6J小鼠BDNF表达，提高空间学习记忆成绩[193]。身体锻炼和热卡限制的模型也表现出脑BDNF表达提高，且与衰老相关认知损害和海马神经可塑性的缓解密切相关[17,66]。因此，阿卡波糖和DNJ缓解了衰老相关海马BDNF水平下降，同时DNJ还提高血清中的BDNF含量，这些效应可能参与了对衰老中脑功能的保护，改善了认知能力。

### 4.3 阿卡波糖和DNJ缓解衰老相关Syt 1和Stx 1水平改变

79

衰老相关性认知功能减退的机制可能与海马和皮质等参与认知功能的脑区内突触蛋白的变化有关。许多研究发现衰老过程中蛋白质水平的改变与学习和记忆能力的下降密切相关[13]。Syt 1分布于突触活性带，是位于突触囊泡上的重要的Ca2+离子感受器。Syt 1的主要功能是介导突触囊泡与SNARE复合体快速同步融合，参与出胞和入胞过程，调解神经递质释放[146]。既往对啮齿类动物衰老相关Syt 1水平变化的研究结果并不一致，有研究显示Wistar大鼠Syt水平随衰老而增加[194]。然而，也有老年和青年大鼠海马内Syt 1含量没有差异的报道[195]。我们以往的研究中发现8月龄和12月龄的SAMP8小鼠均表现衰老相关背海马Syt 1含量升高[122]。在本实验中，我们采用了免疫组化染色方法研究了各组小鼠海马各层Syt 1相对含量，结果显示老年P8小鼠海马除DG门区以外各亚层的Syt 1含量均较青年鼠高，与我们既往研究结果一致。

老年P8小鼠海马Syt 1升高机制不明，可能是衰老过程中其它突触蛋白（如突触短杆素和Stx）减少的代偿性反应。神经元内钙离子浓度升高，轴浆运输减慢，特别是逆行运输障碍也可能导致突触前末端Syt 1积聚[122, 196]。某些病理状态下Syt

1水平可能升高，如胚胎期母体暴露应激压力导致子代大鼠海马Syt 1表达水平升高[197]。阿卡波糖组小鼠在除DG门区之外的海马层Syt 1表达量比老年对照鼠低，表明阿卡波糖缓解了老年SAMP8鼠海马内Syt 1升高。与阿卡波糖效果相似的，HD-DNJ组小鼠也在除DG门区之外的海马层Syt 1水平低于老年对照，LD-DNJ组小鼠在DG细胞层和分子层, CA1分子层和放射层, CA1起层和CA3透明层之外的海马层Syt 1水平明显较低，表明DNJ降低了老年SAMP8鼠海马内Syt 1。相关性分析显示Syt 1水平和衰老相关认知损害密切相关，提示Syt 1水平改变可能参与了阿卡波糖和DNJ缓解衰老相关的认知功能下降。

Stx 1是突触前活性带SNARE复合体蛋白成员之一，在突触囊泡融合和突触传递过程中起重要作用。有报道老年正常大鼠大脑Stx 1水平减少[147]。这种老年啮齿类动物Stx 1含量降低与认知成绩下降有密切关系[143]。在5XFAD转基因AD小鼠脑组织Stx、突触短杆素、突触后致密蛋白95均随年龄增长水平下降[198]。对于痴呆患者的研究发现其颞上回Stx的mRNA表达水平较低，与痴呆严重程度有

80

显著相关性，而且Stx的水平随衰老而降低[199]。

本实验中，我们采用了免疫组化染色方法研究了各组小鼠海马各层Stx 1相对含量，结果显示老年P8小鼠海马除DG门区以外各亚层的Stx 1含量均较青年鼠高在本研究中，老年P8鼠海马内Stx 1水平降低，而且和衰老相关的记忆能力损害相关。阿卡波糖组小鼠CA3透明层和分子层的Stx 1水平较老年对照鼠高，HD-DNJ组小鼠DG门区，CA1放射层和CA3分子层Stx 1表达水平较高，LD-DNJ组小鼠DG门区的Stx 1水平较高，表明阿卡波糖和DNJ缓解了老年SAMP8鼠海马内Stx 1含量降低。本实验中，我们通过相关性分析探讨Stx 1水平变化与小鼠学习记忆能力减退的关系。结果发现，Stx 1水平越低，学习记忆能力损害越严重。

这种相关性可能是由于Stx 1调节突触传递，Stx 1降低可能抑制认知功能，也有可能是Stx 1 水平和认知功能降低是衰老过程中的伴发现象。长期服用阿卡波糖和

DNJ缓解海马内Stx 1水平降低的机制不明，可能与这两种药物长期使用对胰岛素系统和心脑血管的保护作用有关，而表观遗传学改变所致突触蛋白相关基因表达变化也可能参与其中。

### 4.4 阿卡波糖和DNJ缓解衰老相关星形胶质细胞活化

越来越多的研究发现过度的神经炎症在正常衰老和衰老相关认知下降的过程中发挥重要作用[150]。正常条件下，星形胶质细胞为神经组织和血-脑屏障的内皮细胞提供营养物质，维持细胞外离子平衡，参与中枢神经系统的修复过程，并且能分泌促进神经元存活的神经营养因子[153]。然而，星形胶质细胞快速和严重的活化会使炎症反应启动或增强，进而导致神经元死亡和脑损伤。以往有体外研究发现，与SAMR1相比，培养的SAMP8小鼠的星形胶质细胞显示了衰老相关功能异常，对神经元的保护能力下降[200]。既往对于老年大鼠的研究发现，记忆损害的老年大鼠海马GFAP表达升高[201]。AD病人和动物模型中也有大脑皮层等脑结构GFAP表达水平增加，星形胶质细胞活化增生[71]。据报道，在各种神经炎性疾病中，GFAP的表达水平能够反映星形胶质细胞活化程度[154]。

本实验中，为了探索阿卡波糖和DNJ对衰老相关星形胶质细胞活化状态有无

81

影响，我们分析了P8鼠海马内GFAP的免疫反应水平。结果显示了老年对照组小鼠大多海马层GFAP表达增加，GFAP阳性星形胶质细胞形态增大，突起增粗，反映了衰老过程中星形胶质细胞活化和胶质增生。

本实验中，长期服用阿卡波糖和DNJ的小鼠海马GFAP水平低于老年对照，提示阿卡波糖和DNJ长期治疗能够缓解衰老相关星形胶质细胞活化。有研究提示炎症反应与胰岛素系统功能关系密切。例如，许多炎症因子，包括TNF-α、IL-1、IL-6等，能够通过干扰胰岛素受体底物正常的酪氨酸磷酸化过程，抑制胰岛素信号传导，从而导致胰岛素抵抗和神经元功能异常[202]。相对应的，胰岛素系统功能和糖代谢异常也可致神经炎症。对于链霉素处理的1型糖尿病小鼠的研究发现，其海马胰岛素水平降低可能导致Aβ显著升高和星形胶质细胞增生[203]。糖尿病小鼠海马胰岛素水平降低，导致中老年动物的衰老症状加速，星形胶质细胞增生[204]。糖代谢异常加速中老年动物的衰老症状，促进青年动物中枢神经系统的病理改变，包括星形胶质细胞数量增多，GFAP染色加深，体积增大，呈阿米巴样改变，星形胶质细胞激活[204]。

此外，相关分析显示GFAP水平与衰老相关认知能力下降有相关性，提示星形细胞活性状态与衰老相关认知能力关系密切。在衰老过程中，星形胶质细胞增生活化，促炎细胞因子过表达、活性氧增多。长期神经炎症增加氧化应激，导致神经元功能异常和凋亡，LTP下降和认知功能损害[152]。衰老相关慢性神经炎症损害认知能力，阿卡波糖和DNJ对海马炎症反应的抑制可能发挥对记忆能力的保护作用。

### 4.5 阿卡波糖和DNJ缓解衰老相关组蛋白乙酰化水平改变

在前文的结果中，我们发现长期服用阿卡波糖或DNJ减轻了老年P8鼠衰老相关神经生化改变，包括胰岛素系统，海马IGF-1R、BDNF和突触蛋白水平，星形胶质细胞活化状态等改变。然而，阿卡波糖或DNJ延缓脑衰老相关行为学和神经生化指标变化的过程是否涉及表观遗传学改变。阿卡波糖或DNJ处理的小鼠组蛋白乙酰化水平有无变化，是否参与了学习记忆能力的改善。这些问题值得研究。

82

因此，我们采用了免疫组织化学法检测各个组小鼠海马各亚区组蛋白H3K9 和

H4K8乙酰化水平的变化情况，以此来初步探索阿卡波糖或DNJ缓解衰老相关认知能力损害的表观遗传学修饰机制。

组蛋白的乙酰化和去乙酰化修饰是基因调控的重要方面。组蛋白乙酰化可发生于组蛋白H2A、H2B、H3、H4，以H3和H4为主，通过中和赖氨酸残基上的正电位，降低组蛋白和DNA的亲和力，促进蛋白的转录和合成过程[159]。随着组蛋白多种修饰方式的发现，组蛋白编码假说被提出，认为组蛋白特定位点的翻译后修饰扩大了基因组编码的信息[161]。单个或多个氨基酸位点的组蛋白修饰，依次或联合介导组蛋白编码。该编码信息由含有特定相互作用的结构域蛋白，如染色体和溴结构域蛋白读取，导致转录激活或抑制、染色体浓缩和DNA修复[205]。其中组蛋白乙酰化主要发挥促进转录的作用，与认知功能密切相关，而由HDAC介导的去组蛋白乙酰化对记忆能力有抑制作用[206]。HDAC家族中的HDAC 2、3、4、

5表达水平升高可能导致记忆损害[207]。有研究发现神经元特异性HDAC2过表达的小鼠，其树突棘密度、突触数量和可塑性降低，记忆形成过程受损，经长期HDAC抑制剂治疗能够缓解。相对应的，Hdac2基因缺陷小鼠的突触数量和记忆易化增加。而且HDAC2 与参与突触可塑性和记忆形成的基因启动子有密切联系，提示

HDAC2 通过影响突触可塑性和长时神经元环路形成，抑制学习记忆能力[206]。近年来，越来越多的研究发现在神经变性疾病中，HAT活性抑制和HDAC 活

性升高可能导致了组蛋白乙酰化稳态异常[207]。例如，对AD患者脑组织尸检发现海马和内嗅皮层HDAC2水平升高，总体组蛋白乙酰化水平较低。在肌萎缩侧索硬化症患者的皮质也有类似发现，提示组蛋白乙酰化水平降低可能是多种神经变性疾病的共同现象，参与了这些疾病的发生发展[207]。对AD转基因模型小鼠的研究显示APP/PS1转基因小鼠和Tg2576转基因小鼠的海马组蛋白H3和H4乙酰化水平均下降。APPPS1-21转基因AD模型鼠在给予HDAC抑制剂丁酸钠治疗后其海马组蛋白乙酰化水平升高，与记忆相关的基因表达增加，显著改善了联想记忆能力[208]。由于组蛋白乙酰化在记忆形成和巩固过程中的重要作用，HDAC抑制剂可以通过抑制HDAC，提高组蛋白乙酰化水平，从而对记忆能力发挥有利作用，不

83

仅具有应用于神经变性疾病患者的潜能，也可有效提高认知功能正常的成年人的认知功能[207]。

目前，关于组蛋白乙酰化修饰是否参与了脑衰老相关认知损害的报道很少。对衰老模型鼠的研究发现，SAMP8小鼠总体组蛋白H3乙酰化水平较SAMR1小鼠降低[209]。在本研究中，我们采用了免疫组化染色的方法分析了各组小鼠组蛋白

H3K9和H4K8乙酰化水平，结果发现老年对照组SAMP8小鼠海马各细胞层内

H3K9乙酰化和H4K8乙酰化水平均低于青年鼠，提示了衰老过程中的特定位点组蛋白乙酰化水平下降。

组蛋白H3K9和H4K8乙酰化水平对认知功能有重要影响。健康青年小鼠在进行情景恐惧记忆任务一小时后组蛋白H3K9、K14、H4K5、K8和K12乙酰化水平升高[162]。C57B/6小鼠给予丁酸钠短期治疗显著升高了海马组蛋白H3K14和H4K8乙酰化水平，提高了可卡因相关的情景记忆[164]。HDAC抑制剂4-苯基丁酸乙酯和辛二酰苯胺异羟肟酸(SAHA)，可以通过提高海马H4K8乙酰化水平，缓解自闭症谱系障碍模型小鼠的社会认知能力[210]。胚胎期暴露砷的子代小鼠H3K9乙酰化水平降低，认知功能减退[211]。

在本研究中，长期服用阿卡波糖或DNJ的小鼠H3K9和H4K8乙酰化水平较老年对照组升高，表明阿卡波糖或DNJ有效缓解了衰老相关特定位点组蛋白乙酰化水平的降低。HD-DNJ比LD-DNJ更能有效提高组蛋白乙酰化水平。相关分析显示H3K9和H4K8乙酰化水平升高与空间和非空间学习记忆以及情景记忆能力有显著相关性。这些结果提示了组蛋白H3K9和H4K8乙酰化可能是参与阿卡波糖或

DNJ提高学习记忆能力的一个非常重要的表观遗传修饰机制。有相似的研究报道了体育锻炼和NaB能够增加BDNF转录产物I和IV，而且与BDNF启动子的组蛋白H4K8乙酰化密切相关[212]。在本章节研究中，长期服用阿卡波糖或DNJ缓解了衰老相关神经生化标志物的改变，但上游机制尚不明确，表观遗传修饰可能参与其中，本实验结果也支持了组蛋白H3K9和H4K8乙酰化在脑衰老过程中的重要作用。然而，在这个探索性的实验中，由于实验设计的限制，我们并不能明确组蛋白乙酰化水平是否直接影响了胰岛素系统、IGF-1、BDNF、突触蛋白等脑功能相

84

关基因的转录、翻译和蛋白表达。在今后的实验中，我们将采用更准确的方法进一步研究干预组蛋白乙酰化水平后特定脑衰老相关基因的转录、翻译和蛋白表达的改变情况。

## 5. 小结

本章研究探讨了阿卡波糖和DNJ能否缓解P8鼠衰老相关病理生理改变，以及这些生化指标的改变与学习记忆能力的相关性。我们研究了多种衰老相关病理生理指标，包括胰岛素系统指标（血糖、血胰岛素、海马胰岛素受体）、和胰岛素信号通路相似的神经营养因子IGF-1和BDNF、突触前活性带蛋白Syt1和Stx 1水平以及海马星形胶质细胞细胞活化标志物GFAP的水平。结果发现P8鼠有衰老相关性血胰岛素和海马胰岛素受体水平、BDNF和Stx 1水平下降，海马IGF-1R、Syt1、

GFAP水平升高，而血糖、血IGF-1和BDNF水平与青年鼠无明显差异。阿卡波糖和DNJ缓解了衰老相关的血胰岛素系统改变、海马IGF-1R和BDNF水平改变、

Syt1和Stx 1水平变化、并且缓解了星形胶质细胞过度活化。这些衰老相关生化指标的改变与行为学有密切的联系，可能参与了衰老相关认知能力损害。这些结果表明阿卡波糖和DNJ缓解脑衰老改变，具有作为抗脑衰老药物应用的潜质。

DNJ的作用具有剂量效应，高剂量较低剂量对缓解衰老相关病理和生化改变效果更为显著。较低剂量的DNJ也发挥了一定缓解脑衰老的作用。对于缓解衰老相关病理生理标志物的改变和组蛋白乙酰化水平改变，同剂量阿卡波糖和DNJ的效用相似。然而也存在差异，尽管衰老对血IGF-1和BDNF水平无显著影响，长期服用DNJ的小鼠血IGF-1和BDNF水平较老年对照升高。差异可能是由于阿卡波糖和DNJ的作用机制不完全一致。相对于阿卡波糖，DNJ具有诸多应用优势。

DNJ广泛分布于自然界多种植物和微生物中，较易经成熟的萃取工艺获得，而且天然性和安全性较好，可以作为食品添加剂，用于日常保健，易于推广，因此具有较广阔的应用前景。

对表观遗传学改变的探索结果显示，老年对照组小鼠海马内H4K8 和H3K9

乙酰化程度较青年对照组降低，表明衰老相关的海马组蛋白乙酰化修饰水平改变。

85

阿卡波糖或DNJ治疗缓解了老年对照海马H4K8和H3K9乙酰化水平下降，提示组蛋白乙酰化修饰可能参与了长期服用阿卡波糖或DNJ治疗缓解小鼠衰老相关行为学和神经生化指标改变的过程。由于本实验所使用的免疫组化染色半定量方法具有一定的局限性，组蛋白修饰修饰及其下游的衰老相关基因转录、翻译和蛋白表达的联系尚待进一步研究。

## 1. 研究结果和结论

# 第四章 总结

在本研究中，我们系统检测了老年SAMP8小鼠行为学改变情况，检测了长期阿卡波糖或DNJ治疗对小鼠衰老相关行为学的影响。行为学结果显示10月龄

SAMP8小鼠感觉运动能力、旷场焦虑水平、空间及非空间学习记忆能力、情景样记忆明显下降。长期阿卡波糖或DNJ治疗部分缓解了这些衰老相关行为学损害，特别是学习记忆能力的下降。高剂量DNJ较低剂量DNJ效果更明显。在行为学检测结束后通过检测衰老相关神经生化指标变化情况和表观遗传学修饰改变情况，探索了阿卡波糖或DNJ治疗对缓解学习记忆能力衰退的神经机制，检测了对衰老相关神经生化指标的影响。结果发现，老年P8小鼠血清中胰岛素水平和海马中胰岛素受体、BDNF和Stx 1表达水平降低，IGF-1受体、Syt 1水平、星形胶质细胞活化标志物GFAP水平增加，组蛋白H3K9和H4K8乙酰化水平降低。长期阿卡波糖或DNJ治疗缓解了这些衰老相关损害。高剂量DNJ的效果较低剂量DNJ更好。而且，相关分析提示衰老相关血胰岛素水平改变、海马亚层中蛋白水平和组蛋白乙酰化水平改变与衰老相关的认知能力损害密切相关。表观遗传学改变可能参与了阿卡波糖或DNJ对衰老相关记忆损害的缓解作用。

## 2. 研究的创新点

基于热卡限制模拟物或抗糖尿病药物可能具有延缓或防止衰老的功能，我们提出阿卡波糖或DNJ可能延缓衰老。我们检测了长期口服阿卡波糖或DNJ对衰老相关行为的影响，也初步探讨了相关机制。该研究的创新点有：①发现了长期口

86

服阿卡波糖或DNJ能够缓解衰老相关行为学损害；②发现了长期口服阿卡波糖或

DNJ能够缓解衰老相关病理生理改变；③将阿卡波糖或DNJ缓解衰老的功能和表观遗传学（组蛋白乙酰化修饰）机制联系起来。该研究为探索新的抗衰老干预方法提供了依据。

## 3. 研究工作的不足和进一步设想

本研究中，我们检测衰老相关性病理生理改变采用了免疫组化染色方法，该方法可以直观观察到特定蛋白在海马各层区的分布定位，而且可以用于半定量分析，但是其数据具有局限性。此外，我们未对其他重要的衰老相关病理生理改变，如细胞凋亡、氧化应激、炎症介质等改变情况进行探索。在下一步的研究工作中，我们将完善上述工作的不足之处，采用更精密准确的定量实验方法从多角度探索阿卡波糖或DNJ缓解脑衰老的机制

本研究仅检测了海马组织结构中两个常见的组蛋白乙酰化位点H3K9和H4K8的乙酰化水平，未检测组蛋白乙酰化中所涉及的关键酶含量，组蛋白修饰的其它内容，如组蛋白甲基化、泛素化，以及表观遗传修饰的其它研究内容，如DNA甲基化。而且，我们未探究组蛋白乙酰化水平对下游的衰老相关或记忆相关基因转录、翻译和蛋白表达的影响。关于长期口服阿卡波糖或DNJ是否确实通过组蛋白修饰机制缓解了衰老，尚待进一步证实。在下一步的研究工作中，我们将继续深入探讨该模型中组蛋白乙酰化水平改变对基因表达水平的影响。

参考文献

[1] Harman D. Aging: phenomena and theories. Ann N Y Acad Sci. 1998; 854: 1-7.

[2] Foster TC. Dissecting the age-related decline on spatial learning and memory tasks in rodent models: N-methyl-D-aspartate receptors and voltage-dependent Ca2+ channels in senescent synaptic plasticity. Prog Neurobiol. 2012; 96: 283-303.

[3] Li KZ, Lindenberger U, Freund AM, et al. Walking while memorizing: age-related

87

Differences in compensatory behavior. Psychol Sci. 2001;12:230-7.

[4] Raz N, Rodrigue KM. Differential aging of the brain: patterns, cognitive correlates and modifiers. Neurosci Biobehav Rev. 2006; 30: 730-48.

[5] Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, et al. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. Cell. 1999; 97: 503-14.

[6] Alexeyev MF, Ledoux SP, Wilson GL. Mitochondrial DNA and aging. Clin Sci (Lond). 2004; 107: 355-64.

[7] Shanley DP, Aw D, Manley NR, et al. An evolutionary perspective on the mechanisms of immunosenescence. Trends Immunol. 2009; 30: 374-81.

[8] Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature. 2000; 408: 239-47.

[9] Solas M, Aisa B, Tordera RM, et al. Stress contributes to the development of central insulin resistance during aging: implications for Alzheimer's disease. Biochim Biophys Acta. 2013; 1832: 2332-9.

[10] Bartke A. Insulin and aging. Cell Cycle. 2008; 7: 3338-43.

[11] Watson GS, Craft S. The role of insulin resistance in the pathogenesis of Alzheimer's disease: implications for treatment. CNS Drugs. 2003; 17: 27-45.

[12] Barzilai N, Huffman DM, Muzumdar RH, et al. The critical role of metabolic pathways in aging. Diabetes. 2012; 61: 1315-22.

[13] Deak F, Sonntag WE. Aging, synaptic dysfunction, and insulin-like growth factor (IGF) -1. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2012; 67: 611-25.

[14] Frolich L, Blum-Degen D, Bernstein HG, et al. Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. J Neural Transm. 1998; 105: 423-38.

[15] Skeberdis VA, Lan J, Zheng X, et al. Insulin promotes rapid delivery of N-methyl-D- aspartate receptors to the cell surface by exocytosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98: 3561-6.

[16] De Felice FG, Vieira MN, Bomfim TR, et al. Protection of synapses against

88

Alzheimer's-linked toxins: insulin signaling prevents the pathogenic binding of Abeta oligomers. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106:1971-6.

[17] Zhao W, Chen H, Xu H, et al. Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. J Biol Chem. 1999; 274: 34893-902.

[18] Thambisetty M, Jeffrey Metter E, Yang A, et al. Glucose intolerance, insulin resistance, and pathological features of Alzheimer disease in the Baltimore Longitudinal Study of Aging. JAMA Neurol. 2013; 70: 1167-72.

[19] Ribeiro RT, Afonso RA, Guarino MP, et al. Loss of postprandial insulin sensitization during aging. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2008; 63: 560-5.

[20] Bosco D, Fava A, Plastino M, et al. Possible implications of insulin resistance and glucose metabolism in Alzheimer's disease pathogenesis. J Cell Mol Med. 2011; 15: 1807-21.

[21] Wrighten SA, Piroli GG, Grillo CA, et al. A look inside the diabetic brain: Contributors to diabetes-induced brain aging. Biochim Biophys Acta. 2009; 1792: 444-53.

[22] Krug R, Benedict C, Born J, et al. Comparable sensitivity of postmenopausal and young women to the effects of intranasal insulin on food intake and working memory. J Clin Endocrinol Metab. 2010; 95: E468-72.

[23] Silverman DH, Small GW, Chang CY, et al. Positron emission tomography in evaluation of dementia: Regional brain metabolism and long-term outcome. JAMA. 2001; 286: 2120-7.

[24] Jagust W, Gitcho A, Sun F, et al. Brain imaging evidence of preclinical Alzheimer's disease in normal aging. Ann Neurol. 2006; 59: 673-81.

[25] Korol DL, Gold PE. Glucose, memory, and aging. Am J Clin Nutr.

1998;67:764S-71S.

89

[26] Irie F, Fitzpatrick AL, Lopez OL, et al. Enhanced risk for Alzheimer disease in persons with type 2 diabetes and APOE epsilon4: the Cardiovascular Health Study Cognition Study. Arch Neurol. 2008; 65: 89-93.

[27] Martin B, Mattson MP, Maudsley S. Caloric restriction and intermittent fasting: two potential diets for successful brain aging. Ageing Res Rev. 2006; 5: 332-53.

[28] Suzuki M, Wilcox BJ, Wilcox CD. Implications from and for food cultures for cardiovascular disease: longevity. Asia Pac J Clin Nutr. 2001; 10: 165-71.

[29] Fontana L, Meyer TE, Klein S, et al. Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101: 6659-63.

[30] Heilbronn LK, de Jonge L, Frisard MI, et al. Effect of 6-month calorie restriction on biomarkers of longevity, metabolic adaptation, and oxidative stress in overweight individuals: a randomized controlled trial. JAMA. 2006; 295: 1539-48.

[31] Anton SD, Karabetian C, Heekin K, et al. Caloric Restriction to Moderate Senescence: Mechanisms and Clinical Utility. Curr Transl Geriatr Exp Gerontol Rep. 2013; 2: 239-46.

[32] Huffman DM, Moellering DR, Grizzle WE, et al. Effect of exercise and calorie restriction on biomarkers of aging in mice. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2008; 294: R1618-27.

[33] Weiss EP, Racette SB, Villareal DT, et al. Improvements in glucose tolerance and insulin action induced by increasing energy expenditure or decreasing energy intake: a randomized controlled trial. Am J Clin Nutr. 2006; 84: 1033-42.

[34] Corbi G, Conti V, Scapagnini G, et al. Role of sirtuins, calorie restriction and physical activity in aging. Front Biosci (Elite Ed). 2012; 4: 768-78.

[35] Ford D, Ions LJ, Alatawi F, et al. The potential role of epigenetic responses to diet in ageing. Proc Nutr Soc. 2011; 70: 374-84.

[36] Erickson KI, Voss MW, Prakash RS, et al. Exercise training increases size of

90

Hippocampus and improves memory. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108:3017-22.

[37] Ahlskog JE, Geda YE, Graff-Radford NR, et al. Physical exercise as a preventive or disease-modifying treatment of dementia and brain aging. Mayo Clin Proc. 2011; 86: 876-84.

[38] Tarumi T, Gonzales MM, Fallow B, et al. Aerobic fitness and cognitive function in midlife: an association mediated by plasma insulin. Metab Brain Dis. 2013; 28: 727-30.

[39] Snigdha S, de Rivera C, Milgram NW, et al. Exercise enhances memory consolidation in the aging brain. Front Aging Neurosci. 2014; 6: 3.

[40] Sigal RJ, Kenny GP, Boule NG, et al. Effects of aerobic training, resistance training, or both on glycemic control in type 2 diabetes: a randomized trial. Ann Intern Med. 2007; 147: 357-69.

[41] DiPietro L, Dziura J, Yeckel CW, et al. Exercise and improved insulin sensitivity in older women: evidence of the enduring benefits of higher intensity training. J Appl Physiol (1985). 2006; 100: 142-9.

[42] Rao X, Zhong J, Xu X, et al. Exercise protects against diet-induced insulin resistance through downregulation of protein kinase Cbeta in mice. PLoS One. 2013; 8: e81364.

[43] Coelho FG, Gobbi S, Andreatto CA, et al. Physical exercise modulates peripheral levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF): a systematic review of experimental studies in the elderly. Arch Gerontol Geriatr. 2013; 56: 10-5.

[44] Marques-Aleixo I, Oliveira PJ, Moreira PI, et al. Physical exercise as a possible strategy for brain protection: evidence from mitochondrial-mediated mechanisms. Prog Neurobiol. 2012; 99: 149-62.

[45] Rotte M, Baerecke C, Pottag G, et al. Insulin affects the neuronal response in the medial temporal lobe in humans. Neuroendocrinology. 2005; 81: 49-55.

[46] Born J, Lange T, Kern W, et al. Sniffing neuropeptides: a transnasal approach to the

Human brain. Nat Neurosci. 2002;5:514-6.

91

[47] Park CR, Seeley RJ, Craft S, et al. Intracerebroventricular insulin enhances memory in a passive-avoidance task. Physiol Behav. 2000; 68: 509-14.

[48] Craft S, Baker LD, Montine TJ, et al. Intranasal insulin therapy for Alzheimer disease and amnestic mild cognitive impairment: a pilot clinical trial. Arch Neurol. 2012; 69: 29-38.

[49] Freiherr J, Hallschmid M, Frey WH, 2nd, et al. Intranasal insulin as a treatment for Alzheimer's disease: a review of basic research and clinical evidence. CNS Drugs. 2013; 27: 505-14.

[50] Schioth HB, Craft S, Brooks SJ, et al. Brain insulin signaling and Alzheimer's disease: current evidence and future directions. Mol Neurobiol. 2012; 46: 4-10.

[51] Benedict C, Hallschmid M, Hatke A, et al. Intranasal insulin improves memory in humans. Psychoneuroendocrinology. 2004; 29: 1326-34.

[52] Benedict C, Kern W, Schultes B, et al. Differential sensitivity of men and women to anorexigenic and memory-improving effects of intranasal insulin. J Clin Endocrinol Metab. 2008; 93: 1339-44.

[53] Benedict C, Dodt C, Hallschmid M, et al. Immediate but not long-term intranasal administration of insulin raises blood pressure in human beings. Metabolism. 2005; 54: 1356-61.

[54] de la Monte SM. Intranasal insulin therapy for cognitive impairment and neurodegeneration: current state of the art. Expert Opin Drug Deliv. 2013; 10: 1699-709.

[55] de la Monte SM, Wands JR. Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: relevance to Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis. 2005; 7: 45-61.

[56] Bartke A. Impact of reduced insulin-like growth factor-1/insulin signaling on aging in mammals: novel findings. Aging Cell. 2008; 7: 285-90.

[57] Kappeler L, De Magalhaes Filho C, Dupont J, et al. Brain IGF-1 receptors control

Mammalian growth and lifespan through a neuroendocrine mechanism. PLoS Biol.

92

2008;6: e254.

[58] Torres Aleman I. Insulin-like growth factor-1 and central neurodegenerative diseases. Endocrinol Metab Clin North Am. 2012; 41: 395-408, vii.

[59] Markowska AL, Mooney M, Sonntag WE. Insulin-like growth factor-1 ameliorates age-related behavioral deficits. Neuroscience. 1998; 87: 559-69.

[60] Marino G, Ugalde AP, Fernandez AF, et al. Insulin-like growth factor 1 treatment extends longevity in a mouse model of human premature aging by restoring somatotroph axis function. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010; 107: 16268-73.

[61] Moloney AM, Griffin RJ, Timmons S, et al. Defects in IGF-1 receptor, insulin receptor and IRS-1/2 in Alzheimer's disease indicate possible resistance to IGF-1 and insulin signalling. Neurobiol Aging. 2010; 31: 224-43.

[62] Carro E, Trejo JL, Gerber A, et al. Therapeutic actions of insulin-like growth factor I on APP/PS2 mice with severe brain amyloidosis. Neurobiol Aging. 2006; 27: 1250-7.

[63] Lupien SB, Bluhm EJ, Ishii DN. Effect of IGF-I on DNA, RNA, and protein loss associated with brain atrophy and impaired learning in diabetic rats. Neurobiol Dis. 2006; 21: 487-95.

[64] Pintana H, Apaijai N, Pratchayasakul W, et al. Effects of metformin on learning and memory behaviors and brain mitochondrial functions in high fat diet induced insulin resistant rats. Life Sci. 2012; 91: 409-14.

[65] Ng TP, Feng L, Yap KB, et al. Long-term metformin usage and cognitive function among older adults with diabetes. J Alzheimers Dis. 2014; 41: 61-8.

[66] Moore EM, Mander AG, Ames D, et al. Increased risk of cognitive impairment in patients with diabetes is associated with metformin. Diabetes Care. 2013; 36: 2981-7.

[67] Bolen S, Feldman L, Vassy J, et al. Systematic review: comparative effectiveness and safety of oral medications for type 2 diabetes mellitus. Ann Intern Med. 2007; 147: 386-99.

[68] Gupta A, Bisht B, Dey CS. Peripheral insulin-sensitizer drug metformin

93

Ameliorates neuronal insulin resistance and Alzheimer's-like changes. Neuropharmacology. 2011;60:910-20.

[69] Lamming DW, Ye L, Sabatini DM, et al. Rapalogs and mTOR inhibitors as anti-aging therapeutics. J Clin Invest. 2013; 123: 980-9.

[70] Anisimov VN. Insulin/IGF-1 signaling pathway driving aging and cancer as a target for pharmacological intervention. Exp Gerontol. 2003; 38: 1041-9.

[71] Heneka MT, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, et al. Acute treatment with the PPARgamma agonist pioglitazone and ibuprofen reduces glial inflammation and Abeta1-42 levels in APPV717I transgenic mice. Brain. 2005; 128: 1442-53.

[72] Rodriguez-Rivera J, Denner L, Dineley KT. Rosiglitazone reversal of Tg2576 cognitive deficits is independent of peripheral gluco-regulatory status. Behav Brain Res. 2011; 216: 255-61.

[73] Gupta R, Gupta LK. Improvement in long term and visuo-spatial memory following chronic pioglitazone in mouse model of Alzheimer's disease. Pharmacol Biochem Behav. 2012; 102: 184-90.

[74] Wang BW, Hok V, Della-Chiesa A, et al. Rosiglitazone enhances learning, place cell activity, and synaptic plasticity in middle-aged rats. Neurobiol Aging. 2012; 33: 835 e13-30.

[75] Abbatecola AM, Lattanzio F, Molinari AM, et al. Rosiglitazone and cognitive stability in older individuals with type 2 diabetes and mild cognitive impairment. Diabetes Care. 2010; 33: 1706-11.

[76] Nissen SE, Wolski K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. N Engl J Med. 2007; 356: 2457-71.

[77] Williamson R, McNeilly A, Sutherland C. Insulin resistance in the brain: an old-age or new-age problemBiochemPharmacol. 2012; 84: 737-45.

[78] McClean PL, Parthsarathy V, Faivre E, et al. The diabetes drug liraglutide prevents

Degenerative processes in a mouse model of Alzheimer's disease. J Neurosci.

94

2011;31:6587-94.

[79] Bomfim TR, Forny-Germano L, Sathler LB, et al. An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease- associated Abeta oligomers. J Clin Invest. 2012; 122: 1339-53.

[80] Rosak C, Mertes G. Critical evaluation of the role of acarbose in the treatment of diabetes: patient considerations. Diabetes Metab Syndr Obes. 2012; 5: 357-67.

[81] Chiasson JL, Josse RG, Gomis R, et al. Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial. Lancet. 2002; 359: 2072-7.

[82] Derosa G, Maffioli P, Ferrari I, et al. Acarbose actions on insulin resistance and inflammatory parameters during an oral fat load. Eur J Pharmacol. 2011; 651: 240-50.

[83] Hirano M, Nakamura T, Obata JE, et al. Early improvement in carotid plaque echogenicity by acarbose in patients with acute coronary syndromes. Circ J. 2012; 76: 1452-60.

[84] Chiasson JL. Acarbose for the prevention of diabetes, hypertension, and cardiovascular disease in subjects with impaired glucose tolerance: the Study to Prevent Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus (STOP-NIDDM) Trial. Endocr Pract. 2006; 12 Suppl 1: 25-30.

[85] Kimura T, Nakagawa K, Kubota H, et al. Food-grade mulberry powder enriched with 1-deoxynojirimycin suppresses the elevation of postprandial blood glucose in humans. J Agric Food Chem. 2007; 55: 5869-74.

[86] Van de Laar FA, Lucassen PL, Akkermans RP, et al. Alpha-glucosidase inhibitors for type 2 diabetes mellitus. Cochrane Database Syst Rev. 2005: CD003639.

[87] Kong WH, Oh SH, Ahn YR, et al. Antiobesity effects and improvement of insulin sensitivity by 1-deoxynojirimycin in animal models. J Agric Food Chem. 2008; 56: 2613-9.

[88] Nakagawa K, Kubota H, Tsuzuki T, et al. Validation of an ion trap tandem mass

Spectrometric analysis of mulberry 1-deoxynojirimycin in human plasma: application to

95

Pharmacokinetic studies. Biosci Biotechnol Biochem. 2008;72:2210-3.

[89] Kojima Y, Kimura T, Nakagawa K, et al. Effects of mulberry leaf extract rich in 1-deoxynojirimycin on blood lipid profiles in humans. J Clin Biochem Nutr. 2010; 47: 155-61.

[90] Tsuduki T, Kikuchi I, Kimura T, et al. Intake of mulberry 1-deoxynojirimycin prevents diet-induced obesity through increases in adiponectin in mice. Food Chem. 2013; 139: 16-23.

[91] Islam B, Khan SN, Haque I, et al. Novel anti-adherence activity of mulberry leaves: inhibition of Streptococcus mutans biofilm by 1-deoxynojirimycin isolated from Morus alba. J Antimicrob Chemother. 2008; 62: 751-7.

[92] Howe JD, Smith N, Lee MJ, et al. Novel imino sugar alpha-glucosidase inhibitors as antiviral compounds. Bioorg Med Chem. 2013; 21: 4831-8.

[93] Balzarini J. The alpha(1, 2) -mannosidase I inhibitor 1-deoxymannojirimycin potentiates the antiviral activity of carbohydrate-binding agents against wild-type and mutant HIV-1 strains containing glycan deletions in gp120. FEBS Lett. 2007; 581: 2060-4.

[94] Tsuruoka T, Fukuyasu H, Ishii M, et al. Inhibition of mouse tumor metastasis with nojirimycin-related compounds. J Antibiot (Tokyo). 1996; 49: 155-61.

[95] Higuchi K, Hosokawa M, Takeda T. Senescence-accelerated mouse. Methods Enzymol. 1999; 309: 674-86.

[96] Chen GH, Wang YJ, Wang XM, et al. Accelerated senescence prone mouse-8 shows early onset of deficits in spatial learning and memory in the radial six-arm water maze. Physiol Behav. 2004; 82: 883-90.

[97] Chen GH, Wang C, Yangcheng HY, et al. Age-related changes in anxiety are task-specific in the senescence-accelerated prone mouse 8. Physiol Behav. 2007; 91: 644-51.

[98] Flood JF, Farr SA, Kaiser FE, et al. Age-related decrease of plasma testosterone in

96

SAMP8 mice: replacement improves age-related impairment of learning and memory. Physiol Behav. 1995;57:669-73.

[99] Pelegri C, Canudas AM, del Valle J, et al. Increased permeability of blood-brain barrier on the hippocampus of a murine model of senescence. Mech Ageing Dev. 2007; 128: 522-8.

[100] Tanaka J, Okuma Y, Tomobe K, et al. The age-related degeneration of oligodendrocytes in the hippocampus of the senescence-accelerated mouse (SAM) P8: a quantitative immunohistochemical study. Biol Pharm Bull. 2005; 28: 615-8.

[101] Han S, Rudd JA, Hu ZY, et al. Analysis of neuronal nitric oxide synthase expression and increasing astrogliosis in the brain of senescence-accelerated-prone 8 mice. Int J Neurosci. 2010; 120: 602-8.

[102] Sureda FX, Gutierrez-Cuesta J, Romeu M, et al. Changes in oxidative stress parameters and neurodegeneration markers in the brain of the senescence-accelerated mice SAMP-8. Exp Gerontol. 2006; 41: 360-7.

[103] Takeda T. Senescence-accelerated mouse (SAM) with special references to neurodegeneration models, SAMP8 and SAMP10 mice. Neurochem Res. 2009; 34: 639-59.

[104] Grady CL, Craik FI. Changes in memory processing with age. Curr Opin Neurobiol. 2000; 10: 224-31.

[105] Barreto G, Huang TT, Giffard RG. Age-related defects in sensorimotor activity, spatial learning, and memory in C57BL/6 mice. J Neurosurg Anesthesiol. 2010; 22: 214-9.

[106] Navarro A, Sanchez Del Pino MJ, Gomez C, et al. Behavioral dysfunction, brain oxidative stress, and impaired mitochondrial electron transfer in aging mice. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2002; 282: R985-92.

[107] Komatsu T, Chiba T, Yamaza H, et al. Manipulation of caloric content but not diet

Composition, attenuates the deficit in learning and memory of senescence-accelerated

97

Mouse strain P8. Exp Gerontol. 2008;43:339-46.

[108] Duan W, Lee J, Guo Z, et al. Dietary restriction stimulates BDNF production in the brain and thereby protects neurons against excitotoxic injury. J Mol Neurosci. 2001; 16: 1-12.

[109] Harrison DE, Strong R, Allison DB, et al. Acarbose, 17-alpha-estradiol, and nordihydroguaiaretic acid extend mouse lifespan preferentially in males. Aging Cell. 2014; 13: 273-82.

[110] Wei ZJ, Zhou LC, Chen H, Chen GH. Optimization of the fermentation conditions for 1-deoxynojirimycin production by Streptomyces lawendulae applying the response surface methodology. Int J Food Engin 2011, 7(3): Article 16, DOI: 10.2202/1556-3758.2354.

[111] Chen GH, Wang H, Yang QG, et al. Acceleration of age-related learning and memory decline in middle-aged CD-1 mice due to maternal exposure to lipopolysaccharide during late pregnancy. Behav Brain Res. 2011; 218: 267-79.

[112] Murai T, Okuda S, Tanaka T, et al. Characteristics of object location memory in mice: Behavioral and pharmacological studies. Physiol Behav. 2007; 90: 116-24.

[113] Dere E, Huston JP, De Souza Silva MA. Episodic-like memory in mice: simultaneous assessment of object, place and temporal order memory. Brain Res Brain Res Protoc. 2005; 16: 10-9.

[114] Roggero P, Gianni ML, Amato O, et al. Influence of protein and energy intakes on body composition of formula-fed preterm infants after term. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2008; 47: 375-8.

[115] Derosa G, Maffioli P. alpha-Glucosidase inhibitors and their use in clinical practice. Arch Med Sci. 2012; 8: 899-906.

[116] Chen GH, Wang YJ, Zhang LQ, et al. Age- and sex-related disturbance in a battery of sensorimotor and cognitive tasks in Kunming mice. Physiol Behav.

2004;83:531-41.

98

[117] Perez-Alvarez L, Baeza I, Arranz L, et al. Behavioral, endocrine and immunological characteristics of a murine model of premature aging. Dev Comp Immunol. 2005; 29: 965-76.

[118] Brenes GA, Guralnik JM, Williamson JD, et al. The influence of anxiety on the progression of disability. J Am Geriatr Soc. 2005; 53: 34-9.

[119] Miyamoto M, Kiyota Y, Nishiyama M, et al. Senescence-accelerated mouse (SAM): age-related reduced anxiety-like behavior in the SAM-P/8 strain. Physiol Behav. 1992; 51: 979-85.

[120] Markowska AL, Spangler EL, Ingram DK. Behavioral assessment of the senescence-accelerated mouse (SAM P8 and R1). Physiol Behav. 1998; 64: 15-26.

[121] Guidi M, Foster TC. Behavioral model for assessing cognitive decline. Methods Mol Biol. 2012; 829: 145-53.

[122] Chen GH, Wang YJ, Qin S, et al. Age-related spatial cognitive impairment is correlated with increase of synaptotagmin 1 in dorsal hippocampus in SAMP8 mice. Neurobiol Aging. 2007; 28: 611-8.

[123] Heyward FD, Walton RG, Carle MS, et al. Adult mice maintained on a high-fat diet exhibit object location memory deficits and reduced hippocampal SIRT1 gene expression. Neurobiol Learn Mem. 2012; 98: 25-32.

[124] Jablonski SA, Schreiber WB, Westbrook SR, et al. Determinants of novel object and location recognition during development. Behav Brain Res. 2013; 256: 140-50.

[125] Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. Cogn Process. 2012; 13: 93-110.

[126] Kuhla A, Lange S, Holzmann C, et al. Lifelong caloric restriction increases working memory in mice. PLoS One. 2013; 8: e68778.

[127] Dere E, Kart-Teke E, Huston JP, et al. The case for episodic memory in animals. Neurosci Biobehav Rev. 2006; 30: 1206-24.

[128] DeVito LM, Eichenbaum H. Distinct contributions of the hippocampus and

99

Medial prefrontal cortex to the" what-where-when" components of episodic-like memory in mice. Behav Brain Res. 2010;215:318-25.

[129] Avogaro A, de Kreutzenberg SV, Fadini GP. Insulin signaling and life span. Pflugers Arch. 2010; 459: 301-14.

[130] Abbott MA, Wells DG, Fallon JR. The insulin receptor tyrosine kinase substrate p58/53 and the insulin receptor are components of CNS synapses. J Neurosci. 1999; 19: 7300-8.

[131] Zhao WQ, Chen H, Quon MJ, et al. Insulin and the insulin receptor in experimental models of learning and memory. Eur J Pharmacol. 2004; 490: 71-81.

[132] Chiu SL, Chen CM, Cline HT. Insulin receptor signaling regulates synapse number, dendritic plasticity, and circuit function in vivo. Neuron. 2008; 58: 708-19.

[133] Ohara T, Doi Y, Ninomiya T, et al. Glucose tolerance status and risk of dementia in the community: the Hisayama study. Neurology. 2011; 77: 1126-34.

[134] Cole AR, Astell A, Green C, et al. Molecular connexions between dementia and diabetes. Neurosci Biobehav Rev. 2007; 31: 1046-63.

[135] Convit A, Wolf OT, Tarshish C, et al. Reduced glucose tolerance is associated with poor memory performance and hippocampal atrophy among normal elderly. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100: 2019-22.

[136] 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 diabetesJAlzheimersDis. 2005; 7: 63-80.

[137] Gil-Bea FJ, Solas M, Solomon A, et al. Insulin levels are decreased in the cerebrospinal fluid of women with prodomal Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis. 2010; 22: 405-13.

[138] Mattson MP, Maudsley S, Martin B. A neural signaling triumvirate that influences ageing and age-related disease: insulin/IGF-1, BDNF and serotonin. Ageing Res Rev.

2004;3:445-64.

100

[139] Aleman A, Torres-Aleman I. Circulating insulin-like growth factor I and cognitive function: neuromodulation throughout the lifespan. Prog Neurobiol. 2009; 89: 256-65.

[140] Muller AP, Fernandez AM, Haas C, et al. Reduced brain insulin-like growth factor I function during aging. Mol Cell Neurosci. 2012; 49: 9-12.

[141] Rothman SM, Griffioen KJ, Wan R, et al. Brain-derived neurotrophic factor as a regulator of systemic and brain energy metabolism and cardiovascular health. Ann N Y Acad Sci. 2012; 1264: 49-63.

[142] Takei N, Sasaoka K, Inoue K, et al. Brain-derived neurotrophic factor increases the stimulation-evoked release of glutamate and the levels of exocytosis-associated proteins in cultured cortical neurons from embryonic rats. J Neurochem. 1997; 68: 370-5.

[143] Vanguilder HD, Freeman WM. The hippocampal neuroproteome with aging and cognitive decline: past progress and future directions. Front Aging Neurosci. 2011; 3: 8.

[144] Ramakrishnan NA, Drescher MJ, Drescher DG. The SNARE complex in neuronal and sensory cells. Mol Cell Neurosci. 2012; 50: 58-69.

[145] Kidokoro Y. Roles of SNARE proteins and synaptotagmin I in synaptic transmission: studies at the Drosophila neuromuscular synapse. Neurosignals. 2003; 12: 13-30.

[146] Paddock BE, Wang Z, Biela LM, et al. Membrane penetration by synaptotagmin is required for coupling calcium binding to vesicle fusion in vivo. J Neurosci. 2011; 31: 2248-57.

[147] VanGuilder HD, Yan H, Farley JA, et al. Aging alters the expression of neurotransmission-regulating proteins in the hippocampal synaptoproteome. J Neurochem. 2010; 113: 1577-88.

[148] Wirths O, Bayer TA. Neuron loss in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. Int J Alzheimers Dis. 2010; 2010.

[149] Jurgens HA, Johnson RW. Dysregulated neuronal-microglial cross-talk during

Aging, stress and inflammation. Exp Neurol. 2012;233:40-8.

101

[150] Corona AW, Fenn AM, Godbout JP. Cognitive and behavioral consequences of impaired immunoregulation in aging. J Neuroimmune Pharmacol. 2012; 7: 7-23.

[151] Hein AM, O'Banion MK. Neuroinflammation and cognitive dysfunction in chronic disease and aging. J Neuroimmune Pharmacol. 2012; 7: 3-6.

[152] Bilbo SD, Smith SH, Schwarz JM. A lifespan approach to neuroinflammatory and cognitive disorders: a critical role for glia. J Neuroimmune Pharmacol. 2012; 7: 24-41.

[153] Haydon PG, Carmignoto G. Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. Physiol Rev. 2006; 86: 1009-31.

[154] Brahmachari S, Fung YK, Pahan K. Induction of glial fibrillary acidic protein expression in astrocytes by nitric oxide. J Neurosci. 2006; 26: 4930-9.

[155] Sloan SA, Barres BA. Mechanisms of astrocyte development and their contributions to neurodevelopmental disorders. Curr Opin Neurobiol. 2014; 27: 75-81.

[156] Simen AA, Bordner KA, Martin MP, et al. Cognitive dysfunction with aging and the role of inflammation. Ther Adv Chronic Dis. 2011; 2: 175-95.

[157] Calvanese V, Lara E, Kahn A, et al. The role of epigenetics in aging and age-related diseases. Ageing Res Rev. 2009; 8: 268-76.

[158] Luger K, Mader AW, Richmond RK, et al. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution. Nature. 1997; 389: 251-60.

[159] Koch CM, Andrews RM, Flicek P, et al. The landscape of histone modifications across 1% of the human genome in five human cell lines. Genome Res. 2007; 17: 691-707.

[160] Peixoto L, Abel T. The role of histone acetylation in memory formation and cognitive impairments. Neuropsychopharmacology. 2013; 38: 62-76.

[161] Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. Science. 2001; 293: 1074-80.

[162] Peleg S, Sananbenesi F, Zovoilis A, et al. Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice. Science. 2010; 328: 753-6.

[163] Bousiges O, Neidl R, Majchrzak M, et al. Detection of histone acetylation levels

102

In the dorsal hippocampus reveals early tagging on specific residues of H2B and H4 histones in response to learning. PLoS One. 2013;8: e57816.

[164] Itzhak Y, Liddie S, Anderson KL. Sodium butyrate-induced histone acetylation strengthens the expression of cocaine-associated contextual memory. Neurobiol Learn Mem. 2013; 102: 34-42.

[165] Ribeiro RA, Batista TM, Coelho FM, et al. Decreased beta-cell insulin secretory function in aged rats due to impaired Ca(2+) handling. Exp Physiol. 2012; 97: 1065-73.

[166] Szoke E, Shrayyef MZ, Messing S, et al. Effect of aging on glucose homeostasis: accelerated deterioration of beta-cell function in individuals with impaired glucose tolerance. Diabetes Care. 2008; 31: 539-43.

[167] Oya J, Nakagami T, Yamamoto Y, et al. Effects of age on insulin resistance and secretion in subjects without diabetes. Intern Med. 2014; 53: 941-7.

[168] Basu R, Breda E, Oberg AL, et al. Mechanisms of the age-associated deterioration in glucose tolerance: contribution of alterations in insulin secretion, action, and clearance. Diabetes. 2003; 52: 1738-48.

[169] Fan R, Kang Z, He L, et al. Exendin-4 improves blood glucose control in both young and aging normal non-diabetic mice, possible contribution of beta cell independent effects. PLoS One. 2011; 6: e20443.

[170] Irwin N, Green BD, Gault VA, et al. Stable agonist of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) restores pancreatic beta cell glucose responsiveness but not glucose intolerance in aging mice. Exp Gerontol. 2006; 41: 151-6.

[171] Ihm SH, Moon HJ, Kang JG, et al. Effect of aging on insulin secretory function and expression of beta cell function-related genes of islets. Diabetes Res Clin Pract. 2007; 77 Suppl 1: S150-4.

[172] Ammon HP, Fahmy A, Mark M, et al. The effect of glucose on insulin release and ion movements in isolated pancreatic islets of rats in old age. J Physiol.

1987;384:347-54.

103

[173] Banks WA. The source of cerebral insulin. Eur J Pharmacol. 2004; 490: 5-12.

[174] Wang X, Zheng W, Xie JW, et al. Insulin deficiency exacerbates cerebral amyloidosis and behavioral deficits in an Alzheimer transgenic mouse model. Mol Neurodegener. 2010; 5: 46.

[175] Ryan AS. Exercise in aging: its important role in mortality, obesity and insulin resistance. Aging health. 2010; 6: 551-63.

[176] Benedict C, Hallschmid M, Schultes B, et al. Intranasal insulin to improve memory function in humans. Neuroendocrinology. 2007; 86: 136-42.

[177] Burns JM, Honea RA, Vidoni ED, et al. Insulin is differentially related to cognitive decline and atrophy in Alzheimer's disease and aging. Biochim Biophys Acta. 2012; 1822: 333-9.

[178] Schubert M, Gautam D, Surjo D, et al. Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101: 3100-5.

[179] Rosak C, Mertes G. Effects of acarbose on proinsulin and insulin secretion and their potential significance for the intermediary metabolism and cardiovascular system. Curr Diabetes Rev. 2009; 5: 157-64.

[180] Li YG, Ji DF, Zhong S, et al. Hybrid of 1-deoxynojirimycin and polysaccharide from mulberry leaves treat diabetes mellitus by activating PDX-1/insulin-1 signaling pathway and regulating the expression of glucokinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucose-6-phosphatase in alloxan-induced diabetic mice. J Ethnopharmacol. 2011; 134: 961-70.

[181] Lee SM, Do HJ, Shin MJ, et al. 1-Deoxynojirimycin isolated from a Bacillus subtilis stimulates adiponectin and GLUT4 expressions in 3T3-L1 adipocytes. J Microbiol Biotechnol. 2013; 23: 637-43.

[182] McNay EC, Recknagel AK. Brain insulin signaling: a key component of cognitive processes and a potential basis for cognitive impairment in type 2 diabetes. Neurobiol

Learn Mem. 2011;96:432-42.

104

[183] Gong X, Ma M, Fan X, et al. Down-regulation of IGF-1/IGF-1R in hippocampus of rats with vascular dementia. Neurosci Lett. 2012; 513: 20-4.

[184] Chung YH, Shin CM, Joo KM, et al. Region-specific alterations in insulin-like growth factor receptor type I in the cerebral cortex and hippocampus of aged rats. Brain Res. 2002; 946: 307-13.

[185] Lopez-Lopez C, Dietrich MO, Metzger F, et al. Disturbed cross talk between insulin-like growth factor I and AMP-activated protein kinase as a possible cause of vascular dysfunction in the amyloid precursor protein/presenilin 2 mouse model of Alzheimer's disease. J Neurosci. 2007; 27: 824-31.

[186] Ron-Harel N, Segev Y, Lewitus GM, et al. Age-dependent spatial memory loss can be partially restored by immune activation. Rejuvenation Res. 2008; 11: 903-13.

[187] Fontana L, Weiss EP, Villareal DT, et al. Long-term effects of calorie or protein restriction on serum IGF-1 and IGFBP-3 concentration in humans. Aging Cell. 2008; 7: 681-7.

[188] Mei F, Nagappan G, Ke Y, et al. BDNF facilitates L-LTP maintenance in the absence of protein synthesis through PKMzeta. PLoS One. 2011; 6: e21568.

[189] Lommatzsch M, Zingler D, Schuhbaeck K, et al. The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelets and plasma. Neurobiol Aging. 2005; 26: 115-23.

[190] Nagahara AH, Tuszynski MH. Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. Nat Rev Drug Discov. 2011; 10: 209-19.

[191] Schaaf MJ, Workel JO, Lesscher HM, et al. Correlation between hippocampal BDNF mRNA expression and memory performance in senescent rats. Brain Res. 2001; 915: 227-33.

[192] Mendelsohn AR, Larrick JW. Epigenetic-mediated decline in synaptic plasticity during aging. Rejuvenation Res. 2012; 15: 98-101.

[193] Li Q, Zhao HF, Zhang ZF, et al. Long-term green tea catechin administration

105

Prevents spatial learning and memory impairment in senescence-accelerated mouse prone-8 mice by decreasing Abeta1-42 oligomers and upregulating synaptic plasticity-related proteins in the hippocampus. Neuroscience. 2009;163:741-9.

[194] Shimohama S, Fujimoto S, Sumida Y, et al. Differential expression of rat brain synaptic proteins in development and aging. Biochem Biophys Res Commun. 1998; 251: 394-8.

[195] Iwamoto M, Hagishita T, Shoji-Kasai Y, et al. Age-related changes in the levels of voltage-dependent calcium channels and other synaptic proteins in rat brain cortices. Neurosci Lett. 2004; 366: 277-81.

[196] Toescu EC, Verkhratsky A, Landfield PW. Ca2+ regulation and gene expression in normal brain aging. Trends Neurosci. 2004; 27: 614-20.

[197] Jia N, Yang K, Sun Q, et al. Prenatal stress causes dendritic atrophy of pyramidal neurons in hippocampal CA3 region by glutamate in offspring rats. Dev Neurobiol. 2010; 70: 114-25.

[198] Oakley H, Cole SL, Logan S, et al. Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. J Neurosci. 2006; 26: 10129-40.

[199] Beeri MS, Haroutunian V, Schmeidler J, et al. Synaptic protein deficits are associated with dementia irrespective of extreme old age. Neurobiol Aging. 2012; 33: 1125 e1-8.

[200] Garcia-Matas S, Gutierrez-Cuesta J, Coto-Montes A, et al. Dysfunction of astrocytes in senescence-accelerated mice SAMP8 reduces their neuroprotective capacity. Aging Cell. 2008; 7: 630-40.

[201] Zhang R, Kadar T, Sirimanne E, et al. Age-related memory decline is associated with vascular and microglial degeneration in aged rats. Behav Brain Res.

2012;235:210-7.

106

[202] De Felice FG, Ferreira ST. Inflammation, defective insulin signaling, and mitochondrial dysfunction as common molecular denominators connecting type 2 diabetes to Alzheimer disease. Diabetes. 2014; 63: 2262-72.

[203] Saravia FE, Revsin Y, Gonzalez Deniselle MC, et al. Increased astrocyte reactivity in the hippocampus of murine models of type 1 diabetes: the nonobese diabetic (NOD) and streptozotocin-treated mice. Brain Res. 2002; 957: 345-53.

[204] Currais A, Prior M, Lo D, et al. Diabetes exacerbates amyloid and neurovascular pathology in aging-accelerated mice. Aging Cell. 2012; 11: 1017-26.

[205] de la Cruz X, Lois S, Sanchez-Molina S, et al. Do protein motifs read the histone codeBioessays. 2005; 27: 164-75.

[206] Guan JS, Haggarty SJ, Giacometti E, et al. HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. Nature. 2009; 459: 55-60.

[207] Graff J, Tsai LH. The potential of HDAC inhibitors as cognitive enhancers. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2013; 53: 311-30.

[208] Govindarajan N, Agis-Balboa RC, Walter J, et al. Sodium butyrate improves memory function in an Alzheimer's disease mouse model when administered at an advanced stage of disease progression. J Alzheimers Dis. 2011; 26: 187-97.

[209] Cosin-Tomas M, Alvarez-Lopez MJ, Sanchez-Roige S, et al. Epigenetic alterations in hippocampus of SAMP8 senescent mice and modulation by voluntary physical exercise. Front Aging Neurosci. 2014; 6: 51.

[210] Foley AG, Cassidy AW, Regan CM. Pentyl-4-yn-VPA, a histone deacetylase inhibitor, ameliorates deficits in social behavior and cognition in a rodent model of autism spectrum disorders. Eur J Pharmacol. 2014; 727: 80-6.

[211] Cronican AA, Fitz NF, Carter A, et al. Genome-wide alteration of histone H3K9 acetylation pattern in mouse offspring prenatally exposed to arsenic. PLoS One. 2013; 8: e53478.

[212] Intlekofer KA, Berchtold NC, Malvaez M, et al. Exercise and sodium butyrate

107

Transform a subthreshold learning event into long-term memory via a brain-derived neurotrophic factor-dependent mechanism. Neuropsychopharmacology. 2013;38:2027-34.

108

附 录

**个人简历**

**基本情况**

**姓名**童晶晶**性别**女**出生年月**1988年12月**籍贯**安徽淮南**学历**医学硕士**专业**神经病学**专业方向**脑衰老及其相关疾病

**单位**安徽医科大学第一附属医院神经内科

**教育及工作经历**

2012/09–2015/06 安徽医科大学，神经病学，博士研究生在读，导师：陈贵海

2005/09–2012/06 安徽医科大学，临床医学，本硕连读

**博士生期间以第一作者发表的 SCI 论著**

Jing-Jing Tong, Gui-Hai Chen, Fang Wang, et al. Chronic Acarbose Treatment Alleviates Age-Related Behavioral and Biochemical Changes in the SAMP8 Mice. Behavioural Brain Research. 2015 May 1;284:138-52. doi: 10.1016/j. bbr.2015.01.052. Epub 2015 Feb 16. (Impact Factor: 3.391, 5-Year Impact Factor: 3.629)

SCI论文在投

Jing-Jing Tong, Gui-Hai Chen, Qi-Gang Yang, et al. Impaired Spatial Learning and Memory is Linked to Neurochemical Indicators of Brain Aging in the Middle-Aged CD-1 Mice with Maternal Exposure to LPS during the Late Embryonic Phase.

Gui-Hai Chen, Jing-Jing Tong, Fang Wang, et al. Chronic 1-Deoxynojirimycin Protects SAMP8 Mice from Age-related Behavioral and Biochemical Changes.

109

参与工作的已发表SCI论文

Wenwen Yan, Gui-Hai Chen, Fang Wang, Jing-Jing Tong, Fei Tao. Long-term acarbose administration alleviating the impairment of spatial learning and memory in the SAMP8 mice was associated with alleviated reduction of insulin system and acetylated H4K8. Brain Res. 2015 Apr 7; 1603:22-31. doi:

10.1016/j. brainres.2015.01.042. Epub 2015 Jan 31.

**参与申请和执行结题的科研项目：**

（1）国家自然科学基金（面上项目）：表观遗传和翻译后修饰机制对衰老海马突触蛋白的影响（81370444, 在研）,2013/10-2016/10；

（2）国家自然科学基金（青年基金）：妊娠期母体暴露脂多糖对子代发生阿尔茨海默病及其表观遗传修饰机制的研究（81301094, 在研），2013/10-2016/10；

（3）国家自然科学基金面上项目：衰老相关性脑内突触活性带蛋白紊乱及其机制

（编号：30872730，已结题），2008/10-2013/10.

110

致 **谢**

三年研究生光阴转瞬即逝，走过的每一个脚步，都让我收获颇丰。毫无疑问，这短暂的三年是我人生中最重要的时期，让我在学习、工作与生活中不断地得到成长与锻炼。三年来，我在学习上所取得的每一份进步，都离不开老师和同学的指导和帮助。

在这里，我首先衷心感谢我的导师陈贵海教授。三年来，无论在课题设计、研究和论文撰写方面，还是在临床学习方面，陈老师不断为我指点迷津，帮助我开拓研究思路，精心点拨、热忱鼓励。他渊博的知识底蕴、严谨的治学态度、一丝不苟的科研工作作风和精湛的医术无不时时刻刻感染着我、激励着我，让我受益匪浅，使我从一个对科研和临床所知甚少的医学生成为今天有了一定科研和临床基础的临床医生，成为他的学生是我今生的幸运。

感谢安医附院神经内科的所有老师在我临床学习阶段给予的无私指导。

感谢安徽医科大学第一附属医院中心实验室的全体老师在我的实验过程中给予的精心指导和帮助。

感谢许文华副主任医师、杨启纲、王芳、曹磊、瞿萍、夏兰等各位师姐，江伟、李学伟师兄及我的师弟师妹随旭、严文文、吴鹏超、魏启国、厉雪燕、张萍等，三年来在学习、生活上给予我的关心和帮助。

最后，我要衷心感谢我的家人，你们的支持和鼓励是我取得所有成绩的基石。我会在心中牢记你们的关爱，一步一个脚印坚定前行！

111

综述

**中枢神经系统胰岛素与脑衰老和阿尔茨海默病**

衰老是指生物体老化的过程，伴随着多种器官、组织、细胞水平上的病理生理损害，其中脑衰老是衰老过程中最影响社会功能的一个方面。衰老相关的认知损害是脑衰老的典型表现，但其具体机制尚不明确。有研究发现胰岛素信号可能参与脑衰老和衰老相关神经变性疾病。以往关于胰岛素的研究多集中于胰岛素在外周器官组织的效应，近年来胰岛素对中枢神经系统(CNS)的影响，特别是对认知功能的影响逐渐被学者们重视。在衰老过程中，外周及中枢胰岛素信号都可能出现异常[1]。认知能力下降的几个危险因素，包括糖尿病，高脂血症，高血压和肥胖都与潜在的胰岛素抵抗有着密切关系[2]。胰岛素抵抗是指胰岛素对靶组织发挥效应的能力下降，信号降低。研究发现老年糖尿病病人患痴呆的风险显著增加[3]，而阿尔茨海默病（AD）的动物模型和病人中也存在胰岛素抵抗[4, 5]。这些研究均提示了胰岛素信号降低可能参与脑衰老和AD的认知损害的神经病理过程。由于衰老是一些神经变性疾病[如AD、帕金森病(PD)]的独立危险因素，因此探索延缓衰老的方法对这些疾病的防治至关重要，而改善大脑中胰岛素的敏感性可能成为新的预防和治疗脑衰老的途径。然而，需要注意的是胰岛素对衰老的影响复杂且有争议，有报道称抑制的，而不是增强的胰岛素/胰岛素样生长因子-1（IGF-1）信号在衰老过程中起保护作用，可能延长寿命[6]。本文将主要对近几年的相关文献报道作一综述，内容包括胰岛素在中枢神经系统的效应，胰岛素在寿命调控、正常衰老相关的认知损害及AD中的作用。

一、CNS中的胰岛素

胰岛素是由胰岛β细胞分泌的激素，在外周组织其主要作用是调控血糖和脂肪代谢，促进血循环中葡萄糖向骨骼肌和脂肪转运。对于CNS内胰岛素来源的研究提示脑内的胰岛素水平基本依赖于外周循环血内的胰岛素跨血脑屏障主动转运

112

至中枢[7]。因此，中枢胰岛素水平可能根据胰腺β细胞的胰岛素分泌功能产生改变。也有研究发现哺乳动物的神经组织有胰岛素样mRNA、前胰岛素原I和II的mRNA、

C肽存在，提示中枢可能有胰岛素合成[8-10]。而且体外培养的兔胚胎神经元能够分泌胰岛素[11]。然而，目前认为成人脑胰岛素合成是被限制的，难以达到检测量，胰岛素可能仅在脑发育的特定时期有少量的合成[7]。在CNS中，胰岛素受体(InsR)在神经元和胶质细胞均有表达，密集分布于脑组织中参与认知功能的活跃部位，包括嗅球、大脑皮质和海马[12]。IGF-1受体和InsR同源，激活相似的胞内信号通路。胰岛素与受体结合后，或者IGF-1与IGF-1受体或InsR结合后，将激活两条主要的信号通路，磷脂酰肌醇3激酶(PI3K) /Akt通路和Ras/丝裂原活化蛋白激酶

（MAPK）通路。这些信号发挥着重要的生理功能，包括维持神经元生存，减少氧化应激损伤，促进学习和记忆功能等[13, 14]。

CNS中的胰岛素的最早为学者们熟知的作用是调节代谢。葡萄糖是脑细胞的主要能源，胰岛素促进葡萄糖跨血脑屏障转运，进入神经元和神经胶质细胞[15]。

InsR结合胰岛素后，发生自身磷酸化，随后使胰岛素受体底物-1(IRS-1)特定位点磷酸化[16]。在进行海马依赖性任务时，胰岛素通过激活PI3K通路活性，刺激蛋白激酶Akt磷酸化，促进葡萄糖转运蛋白4（GLUT4）转运至海马质膜，快速升高神经元糖利用率[15]。PI3K/Akt通路激活还可以使糖原合成激酶-3-β(GSK3β)磷酸化失活，从而增加糖原合成[17]，并且可通过激活雷帕霉素(mTOR)信号促进蛋白质合成[18]。此外，胰岛素还可以通过一个非经典的蛋白激酶C(PKC) /核因子-κB (NF-κB)通路调节大鼠脑微血管内皮细胞P-糖蛋白的水平，以往该通路被忽视，可能是由于PKC和PI3K的作用重叠，而且PKC活性可以升高PI3K水平[19]。

CNS中的胰岛素信号对神经系统有保护作用。PI3K/Akt下游的信号分子，包括mTOR、叉形头转录因子O3(FoxO3)、NF-κB. mTOR信号通过抑制凋亡信号保护细胞生存[20]。Akt使FoxO3发生磷酸化抑制，防止线粒体膜电位和细胞色素c释放的破坏从而保护神经元[21]；NF-κB磷酸化能够减少氧化应激和凋亡[22]。胰岛素激活的MAPK通路也有神经保护作用，能够防止神经元和非神经元细胞凋亡，促进葡萄糖转运，促进细胞和突触生长相关基因的表达，增加细胞增殖[23]。该通

113

路激活还显示出抗氧化功能，在氧化应激状态下促进抗氧化相关的基因表达增加，但仅见于外周脂肪或肌肉组织，在CNS是否发挥这些效应还有待研究[24]。

早期对CNS内胰岛素功能的研究还包括其调控食欲和体型的效应。脑室内注射胰岛素的动物表现出食物摄取减少和体重降低[25]。其机制可能是胰岛素通过激活PI3K通路，诱导了ATP依赖的下丘脑神经元钠离子通道激活，导致部分促食欲的刺鼠相关肽神经元失活[26]。另外，注射胰岛素还可能降低促进食欲的神经肽 Y

（NPY）的表达，增加抑食欲神经肽阿黑皮素原（POMC）和可卡因和安非他明调节转录产物（CART）在弓状核的表达，使食物摄入量减少。特异性敲除脑InsR的小鼠表现食物摄入增加和轻度肥胖[27]。因此，胰岛素抵抗可能通过促进进食和肥胖导致代谢综合征、慢性炎症状态、脑血管病变、高糖血症的发生率增加。

目前，有越来越多的证据表明中枢胰岛素活性参与认知功能。研究发现，糖尿病患者发生痴呆的风险大大增加[28]。1型糖尿病(T1DM)患者的认知功能轻度降低。T1DM患儿的执行功能，全智商（IQ），运动速度成绩较差，而成人患者在智商、执行功能、记忆（包括空间记忆）、运动速度均表现能力减退[29]。严重的低血糖发作，慢性高血糖和发病年龄都是显著影响T1DM患者认知功能的因素。T1DM患者的发病年龄越早，认知衰退越严重[29]。糖化血红蛋白（HbA1c）水平（评估长期血糖水平）较高的患者表现出精神运动效率降低[30]。

T2DM患者执行功能、工作记忆、精神运动和注意力功能的测试均受到损害，发生AD的风险增加。执行功能和选择反应时间的损害会对日常生活产生严重影响，尤其是增加了老年人跌倒的风险[31]。影像学研究发现T2DM与全脑萎缩和小血管疾病负担增大密切相关，衰老和血管危险因素加重这些变化[32]。2014年的一篇荟萃分析发现HbAlc浓度和血糖变异性，与T2DM患者的认知功能存在负相关，但是这种关联的强度较弱，提示血糖水平仅是影响认知的其中一个因素[33]。胰岛素抵抗可能是更为重要的一个因素。T2DM患者有外周胰岛素抵抗，可引发高胰岛素血症，减少血-脑屏障（BBB）InsR的表达，导致脑摄取的胰岛素减少，使脑内胰岛素信号受损[34]。

在CNS内，胰岛素作为一种神经调质，能够直接或间接调节突触神经递质的

114

释放[35, 36]。胰岛素信号对突触可塑性发挥重要的调节作用，包括调节突触数目、树突可塑性、视觉环路功能、长时程增强（LTP）和长时程抑制（LTD）[37]。胰岛素可诱导PSD95表达，PSD95是突触后连接形成所必需的支架蛋白[38]。研究发现胰岛素信号与大脑皮质和海马突触内离子通道和神经递质受体的转运和招募有关

[39]. 例如，胰岛素通过使N-甲基-D-天冬氨酸(NMDAR)的NR2A和NR2B亚基发生酪氨酸磷酸化，激活兴奋性突触上NMDAR的膜招募，促进NMDAR快速转运至细胞表面，诱导长时程增强(LTP)，加强学习记忆功能[14, 40]。因此，胰岛素依赖的突触后膜NMDAR活性增加参与了海马LTP形成[41]。胰岛素还能调节小脑和海马的谷氨酸离子门控型a-氨基-3-羟基-5-甲基-异恶唑丙酸受体(AMPAR)，通过PI3K-PKC通路激活钙离子依赖的AMPAR内吞[42, 43]。在海马CA1神经元，这种兴奋性突触末端的AMPAR活性下调参与了胰岛素诱导的长时程抑制(LTD)，LTD通常被认为是记忆巩固和灵活性所必需的[44]。

鉴于胰岛素信号对突触可塑性的调节作用，胰岛素信号降低可能导致记忆能力减退。在神经退行性疾病中，海马胆碱能突触末端的减少可能抑制LTP，与记忆损害密切相关[45]。动物实验发现在大鼠海马CA1区，乙酰胆碱形成的限速酶胆碱乙酰转移酶（ChAT）与胰岛素信号的主要蛋白如InsR亚基，IRS-1, Akt和GSK3β共定位[46]，提示胰岛素信号在胆碱能神经元功能稳态中起到关键作用。脑内注射链球菌素ic-STZ的啮齿类动物模型是一个常用的糖尿病模型，该模型脑组织ChAT

mRNA的表达减少，乙酰胆碱酯酶(AChE) mRNA表达增加，表明胆碱能神经传递降低[47]，而且还显示中枢胰岛素信号下降和谷氨酸能神经传递突触后功能障碍，

LTP降低以及认知缺陷[48]。GSK3β是连接突触可塑性和胰岛素信号通路之间的一个重要的酶，其活性的抑制对于海马LTP的诱导是必不可少的[49]。在ic-STZ模型中，InsRS的表达和敏感性下降，导致GSK3β的长期激活，抑制LTP，可能是胰岛素信号下降导致糖尿病或认知损害的机制之一[47]。

二、胰岛素和寿命

近年来，有许多研究提示了胰岛素-生长因子(GH) -IGF-1信号参与调控寿命[50]。

115

早期很多对于衰老和寿命的基因控制的机制研究来自于无脊椎动物，如秀丽隐杆线虫（C. elegans）、果蝇的模型。秀丽隐杆线虫分泌类似于哺乳动物的胰岛素的一种胰岛素样肽，其相应的受体Daf2与哺乳动物的InsR、IGF-1受体有同源性[51]。抑制其胰岛素样肽水平和/或抑制Daf2活性，不完全敲出胰岛素样肽或其受体，可显著延长寿命[52]。在果蝇研究中，胰岛素受体或其配体的突变导致相应通路信号降低，应激抵抗力增加，也表现寿命延长[53]。

在哺乳动物研究中，降低胰岛素/IGF-1信号的基因突变小鼠的平均和最长寿命显著延长，AD相关的病理特征有所改善[6]。抑制雷帕霉素mTORC1信号也使小鼠寿命延长[54]。然而，由于胰岛素和IGF-1都能和InsR结合，因此在GH和IGF-1信号降低的效应中，把胰岛素的特定作用从中区别出来较为困难。有研究提示GH和IGF-1信号下降影响寿命，其机制可能与胰岛素敏感性增加有关[50]。生长激素缺乏或抵抗的变异小鼠，如Ghr/Ghbp(-/-GHRKO)生长激素受体敲除小鼠的血胰岛素水平较低，胰岛素敏感性增加，寿命延长[55]。表达GH拮抗剂的转基因小鼠表现血浆IGF1 水平下降，胰岛素水平及敏感性未改变，寿命没有变化[55]。过表达

GH 的多个小鼠模型的寿命减少，可能与胰岛素抵抗有关[56]。脂肪InsR 敲除

（―FIRKO‖）的小鼠模型体型较瘦，发育正常，胰岛素敏感，寿命延长，发生衰老相关和高脂饮食诱导的肥胖和糖耐量异常的几率降低[57]。

但是，也有类似模型的研究发现其寿命延长的机制不能单纯用胰岛素敏感性改变来解释。例如，敲除单拷贝IGF-1R基因的Igf1r(+/-)小鼠，寿命延长约26%，雌鼠较明显，而雄鼠寿命延长未达统计学意义。雄鼠胰岛素敏感性降低，而雌鼠胰岛素敏感性增加[58]。IRS-1敲除的Irs1 (-/-)小鼠寿命延长，且主要见于雌鼠，尽管雌鼠有轻度的胰岛素抵抗[59]。特异性敲除脑内IRS-2杂合子(bIrs2 +/-)小鼠寿命延长，但表现胰岛素抵抗，而系统敲除IRS-2基因提高胰岛素敏感性[60]。尽管机制不明，这些结果提示了胰岛素敏感性本身并不是胰岛素/GH/IGF-I信号改变的动物模型的寿命延长的必要条件。

在人类中，胰岛素抵抗和高胰岛素血症与高血压，高血脂，肥胖和衰老疾病

（心血管疾病、T2DM 和肿瘤）的发病率显著增加有关[61]。胰岛素信号异常还参

116

与了衰老相关神经变性疾病如AD的发病[62]。进行热卡或饮食限制的人类产生类似于啮齿类动物的变化，能够延长寿命，其效应还包括减轻肥胖，提高胰岛素敏感性，减轻氧化应激和炎症损伤，这些都可能是其延长寿命的机制[63]。然而，长期严格控制饮食的方案不仅难以在中老年人实施，还可能产生营养失衡，感染的易感性升高和伤口愈合异常等不良影响，因此评估成功的老龄化所需的热卡限制程度和饮食结构的调整需要更进一步的研究。

三、胰岛素和衰老相关认知损害

胰岛素信号对衰老的影响机制复杂，衰老可能和特定器官或细胞的胰岛素活性有关，特别是脑内的胰岛素信号。在衰老过程中，脑组织中胰岛素、C肽和InsR水平随年龄升高而降低[10]。老年BALB: c-nu小鼠全脑胰岛素高亲和力结合位点减少[64]。关于衰老对葡萄糖稳态的影响的研究发现，在糖尿病患者，胰岛素分泌和胰岛素的敏感性，糖耐量均随衰老降低[65]。正常人的空腹血糖水平随年龄增加而增加。年龄与胰岛β细胞功能指数（HOMA-B）呈负相关，在男性和绝经后女性年龄与稳态模型胰岛素抵抗指数（HOMA-IR）正相关[66]。有研究报道男性衰老相关空腹血糖水平升高和胰岛β细胞功能关系更为密切，而不是胰岛素抵抗[67]。

胰岛素分泌可受多种因素影响，包括肥胖度，健康水平，抗胰岛素激素（如，胰高血糖素，生长激素，皮质醇）的浓度[68]。对衰老模型血浆胰岛素水平的报道有不一致的结果，老年啮齿类动物有更高的空腹或非空腹胰岛素水平，可能是胰岛素抵抗的代偿反应[69, 70]；也有报道显示老年和年轻小鼠空腹胰岛素无明显区别

[71]. 较为一致的发现是老年啮齿类动物血浆和胰岛测定的葡萄糖诱导的胰岛素分泌量均降低[70, 71]。

即使没有糖尿病，IR和糖耐量异常也与加速的衰老相关的认知损害和海马缩小密切相关[72]。增加胰岛素敏感性或减少胰岛素抵抗的方法可改善衰老相关认知下降。限制热量摄入可以提高胰岛素敏感性，改善人类和啮齿类动物学习记忆能力[73, 74]。增强胰岛素作用的药物（苯乙双胍，丁双胍，二甲双胍，）已被证明能增加葡萄糖利用率，减轻高血糖症，增加寿命，并减少衰老相关疾病的发病[75]。然

117

而，胰岛素信号传导对脑衰老的保护作用很复杂，可能与其它机制相互作用。例如，神经元特异性胰岛素受体基因敲除(NIRKO)小鼠仅表现胰岛素介导的PI3K活性消失，Akt和GSK3β的磷酸化减少和tau过度磷酸化，但是并没有表现记忆障碍[76]。

四、胰岛素和AD

认知能力下降是脑衰老和AD的共同症状。AD的临床特征包括以人格改变，进行性认知损害和记忆力减退，病理表现包括细胞外淀粉样蛋白β（Aβ）异常沉积形成的老年斑，神经原纤维缠结，小胶质细胞及星形细胞的活跃和增生，神经元及突触的缺失[77]**。**近年来有研究提示胰岛素系统异常可能促进了AD发病和进展[12]。流行病学研究发现糖尿病患者认知下降速度快，发生AD 的风险升高。胰岛素抵抗与AD发病风险密切相关[12]。反之，AD患者也可表现不同程度中枢胰岛素系统紊乱，包括脑内胰岛素，脑脊液中胰岛素和/或脑脊液/血浆胰岛素的比例下降，InsR表达下降，酪氨酸激酶活性降低和IRS功能异常[62, 78]。AD患者脑胰岛素水平下降与认知损害密切相关[79]。PI3K/Akt信号异常介导的GLUTs活性降低和表达减少可能导致脑葡萄糖代谢减退和随后的线粒体代谢和ATP产生减少[80]。

目前已有多个研究发现胰岛素参与Aβ代谢过程。Aβ是由淀粉样蛋白前体蛋白APP经β，γ分泌酶水解途径产生的多肽[81]。AD的发病机制的经典学说“Aβ级联反应学说”认为Aβ是AD发病的始动因素，激活一系列有害的级联反应，导致氧化应激、慢性炎症、神经元凋亡，最终导致认知功能减退。虽然也有其它学说和研究认为Aβ并不是AD的起因，而可能是AD发病过程中的结果之一，但毋庸置疑的是Aβ是个重要的标志性的且有害的因素。而中枢胰岛素可以提高a-分泌酶活性，催化APP产生可溶性sAPP，使Aβ生成减少[82]。如果发生胰岛素抵抗，则可能导致脑BACE1/β分泌酶和-γ-分泌酶的转录活性增加，自噬体聚集，从而促使

APP产生Aβ[82, 83]。另外，胰岛素和Aβ都是由胰岛素降解酶（IDE）代谢清除，因此互为竞争性抑制剂。严重的AD患者的海马IDE活性和mRNA和蛋白质水平降低，与脑Aβ含量负相关[84]。AD小鼠模型补充胰岛素，能够通过MAPK通路

118

促进Aβ的转运清除，缓解认知缺陷[85]。

Aβ也可以反过来对胰岛素信号产生影响。Aβ寡聚体可以通过肿瘤坏死因子/ C-Jun N-末端激酶途径，诱导IRS-1异常磷酸化和信号受损，显著降低PI3K信号传导分子的表达[78, 86]。Aβ竞争性抑制胰岛素与InsR的结合[87]。另外，胞内Aβ和胰岛素信号降低均可以使Akt的活性降低，导致GSK3B延长活化，LTP受抑制和tau 蛋白过度磷酸化[88]。胰岛素信号和糖代谢损害，导致的晚期糖化终产物

（AGEs）的形成增加，氧化应激增加，线粒体功能障碍，神经细胞凋亡，进而导致神经退行性疾病相关的认知功能障碍[89]。

小剂量经鼻给予胰岛素能减轻AD患者的认知损害[90]。热卡限制和治疗糖尿病的药物，如罗格列酮，吡格列酮均可缓解AD模型鼠的疾病进展，提高认知功能，能够改善胰岛素敏感性，改善AD患者的认知能力[91, 92]。胰高血糖素样肽-1可作用于胰岛β细胞，促进胰岛素基因的转录、胰岛素的合成和分泌，缓解AD模型鼠的症状和神经变性[86]。

五、展望

目前，脑衰老的具体机制尚不明确。胰岛素对突触可塑性和认知功能发挥重要的调节作用。在衰老过程中，胰岛素抵抗或缺乏所导致的中枢神经系统胰岛素信号异常可能参与了衰老相关的认知损害。然而，对于脑胰岛素信号对认知功能的影响，在糖尿病或AD病人或模型的研究较多，而胰岛素在正常脑衰老中的作用的研究较少。而且胰岛素异常的上游始动因素尚不明确。由于也有报道发现胰岛素信号异常并不一定影响认知功能，因此胰岛素可能与其它机制存在复杂的相互作用，共同影响脑衰老，而其中机制尚需探讨。在将来的研究中，积极探索改善大脑中胰岛素信号的干预方法，并探讨其是否影响脑衰老以及其中的分子机制将为深入理解脑衰老的发生发展提供更复合的信息，也无疑能为有效预防和治疗脑衰老的提供支持和新的思路。

119

参考文献

[1] Barzilai N, Huffman DM, Muzumdar RH, et al. The critical role of metabolic pathways in aging. Diabetes. 2012; 61: 1315-22.

[2] Alberti KG, Zimmet P. The metabolic syndrome: time to reflect. Curr Diab Rep. 2006; 6: 259-61.

[3] Burdo JR, Chen Q, Calcutt NA, et al. The pathological interaction between diabetes and presymptomatic Alzheimer's disease. Neurobiol Aging. 2009; 30: 1910-7.

[4] Wang X, Zheng W, Xie JW, et al. Insulin deficiency exacerbates cerebral amyloidosis and behavioral deficits in an Alzheimer transgenic mouse model. Mol Neurodegener. 2010; 5: 46.

[5] Cole GM, Frautschy SA. The role of insulin and neurotrophic factor signaling in brain aging and Alzheimer's Disease. Exp Gerontol. 2007; 42: 10-21.

[6] Bishop NA, Lu T, Yankner BA. Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. Nature. 2010; 464: 529-35.

[7] Banks WA. The source of cerebral insulin. Eur J Pharmacol. 2004; 490: 5-12.

[8] Devaskar SU, Giddings SJ, Rajakumar PA, et al. Insulin gene expression and insulin synthesis in mammalian neuronal cells. J Biol Chem. 1994; 269: 8445-54.

[9] Schechter R, Beju D, Gaffney T, et al. Preproinsulin I and II mRNAs and insulin electron microscopic immunoreaction are present within the rat fetal nervous system. Brain Res. 1996; 736: 16-27.

[10] Frolich L, Blum-Degen D, Bernstein HG, et al. Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. J Neural Transm. 1998; 105: 423-38.

[11] Schechter R, Whitmire J, Wheet GS, et al. Immunohistochemical and in situ hybridization study of an insulin-like substance in fetal neuron cell cultures. Brain Res. 1994; 636: 9-27.

[12] Craft S, Cholerton B, Baker LD. Insulin and Alzheimer's disease: untangling the

120

Web. J Alzheimers Dis. 2013;33 Suppl 1: S263-75.

[13] Saltiel AR, Pessin JE. Insulin signaling pathways in time and space. Trends Cell Biol. 2002; 12: 65-71.

[14] Skeberdis VA, Lan J, Zheng X, et al. Insulin promotes rapid delivery of N-methyl-D- aspartate receptors to the cell surface by exocytosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98: 3561-6.

[15] Grillo CA, Piroli GG, Hendry RM, et al. Insulin-stimulated translocation of GLUT4 to the plasma membrane in rat hippocampus is PI3-kinase dependent. Brain Res. 2009; 1296: 35-45.

[16] Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, et al. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. Nature. 1991; 352: 73-7.

[17] Lee J, Kim MS. The role of GSK3 in glucose homeostasis and the development of insulin resistance. Diabetes Res Clin Pract. 2007; 77 Suppl 1: S49-57.

[18] Lynch CJ, Patson BJ, Goodman SA, et al. Zinc stimulates the activity of the insulin- and nutrient-regulated protein kinase mTOR. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2001; 281: E25-34.

[19] Liu H, Yang H, Wang D, et al. Insulin regulates P-glycoprotein in rat brain microvessel endothelial cells via an insulin receptor-mediated PKC/NF-kappaB pathway but not a PI3K/Akt pathway. Eur J Pharmacol. 2009; 602: 277-82.

[20] Zhuang Z, Zhao X, Wu Y, et al. The anti-apoptotic effect of PI3K-Akt signaling pathway after subarachnoid hemorrhage in rats. Ann Clin Lab Sci. 2011; 41: 364-72.

[21] van der Heide LP, Ramakers GM, Smidt MP. Insulin signaling in the central nervous system: learning to survive. Prog Neurobiol. 2006; 79: 205-21.

[22] Rojo AI, Salinas M, Martin D, et al. Regulation of Cu/Zn-superoxide dismutase expression via the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt pathway and nuclear factor-kappaB. J Neurosci. 2004; 24: 7324-34.

[23] Schechter R, Yanovitch T, Abboud M, et al. Effects of brain endogenous insulin on

121

Neurofilament and MAPK in fetal rat neuron cell cultures. Brain Res. 1998;808:270-8.

[24] Duarte AI, Moreira PI, Oliveira CR. Insulin in central nervous system: more than just a peripheral hormone. J Aging Res. 2012; 2012: 384017.

[25] Woods SC, Lotter EC, McKay LD, et al. Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. Nature. 1979; 282: 503-5.

[26] Konner AC, Janoschek R, Plum L, et al. Insulin action in AgRP-expressing neurons is required for suppression of hepatic glucose production. Cell Metab. 2007; 5: 438-49.

[27] Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, et al. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. Science. 2000; 289: 2122-5.

[28] Ohara T, Doi Y, Ninomiya T, et al. Glucose tolerance status and risk of dementia in the community: the Hisayama study. Neurology. 2011; 77: 1126-34.

[29] Tonoli C, Heyman E, Roelands B, et al. Type 1 diabetes-associated cognitive decline: A meta-analysis and update of the current literature 1meta. J Diabetes. 2014; 6: 499-513.

[30] Jacobson AM, Musen G, Ryan CM, et al. Long-term effect of diabetes and its treatment on cognitive function. N Engl J Med. 2007; 356: 1842-52.

[31] Wong RH, Scholey A, Howe PR. Assessing premorbid cognitive ability in adults with type 2 diabetes mellitus-a review with implications for future intervention studies. Curr Diab Rep. 2014; 14: 547.

[32] Biessels GJ, Reijmer YD. Brain changes underlying cognitive dysfunction in diabetes: what can we learn from MRIDiabetes. 2014; 63: 2244-52.

[33] Geijselaers SL, Sep SJ, Stehouwer CD, et al. Glucose regulation, cognition, and brain MRI in type 2 diabetes: a systematic review. Lancet Diabetes Endocrinol. 2014.

[34] Baker LD, Cross DJ, Minoshima S, et al. Insulin resistance and Alzheimer-like reductions in regional cerebral glucose metabolism for cognitively normal adults with prediabetes or early type 2 diabetes. Arch Neurol. 2011; 68: 51-7.

[35] Hajnal A, Pothos EN, Lenard L, et al. Effects of feeding and insulin on

122

Extracellular acetylcholine in the amygdala of freely moving rats. Brain Res. 1998;785:41-8.

[36] Brass BJ, Nonner D, Barrett JN. Differential effects of insulin on choline acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase activities in neuron-rich striatal cultures. J Neurochem. 1992; 59: 415-24.

[37] Chiu SL, Chen CM, Cline HT. Insulin receptor signaling regulates synapse number, dendritic plasticity, and circuit function in vivo. Neuron. 2008; 58: 708-19.

[38] Lee CC, Huang CC, Wu MY, et al. Insulin stimulates postsynaptic density-95 protein translation via the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway. J Biol Chem. 2005; 280: 18543-50.

[39] Wan Q, Xiong ZG, Man HY, et al. Recruitment of functional GABA(A) receptors to postsynaptic domains by insulin. Nature. 1997; 388: 686-90.

[40] Christie JM, Wenthold RJ, Monaghan DT. Insulin causes a transient tyrosine phosphorylation of NR2A and NR2B NMDA receptor subunits in rat hippocampus. J Neurochem. 1999; 72: 1523-8.

[41] van der Heide LP, Kamal A, Artola A, et al. Insulin modulates hippocampal activity-dependent synaptic plasticity in a N-methyl-d-aspartate receptor and phosphatidyl-inositol-3-kinase-dependent manner. J Neurochem. 2005; 94: 1158-66.

[42] Huang CC, Lee CC, Hsu KS. An investigation into signal transduction mechanisms involved in insulin-induced long-term depression in the CA1 region of the hippocampus. J Neurochem. 2004; 89: 217-31.

[43] Wang YT, Linden DJ. Expression of cerebellar long-term depression requires postsynaptic clathrin-mediated endocytosis. Neuron. 2000; 25: 635-47.

[44] Ge Y, Dong Z, Bagot RC, et al. Hippocampal long-term depression is required for the consolidation of spatial memory. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010; 107: 16697-702.

[45] Kanju PM, Parameshwaran K, Sims-Robinson C, et al. Selective cholinergic

Depletion in medial septum leads to impaired long term potentiation and glutamatergic

123

Synaptic currents in the hippocampus. PLoS One. 2012;7: e31073.

[46] Wang H, Wang R, Zhao Z, et al. Coexistences of insulin signaling-related proteins and choline acetyltransferase in neurons. Brain Res. 2009; 1249: 237-43.

[47] Lester-Coll N, Rivera EJ, Soscia SJ, et al. Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: relevance to sporadic Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis. 2006; 9: 13-33.

[48] Shonesy BC, Thiruchelvam K, Parameshwaran K, et al. Central insulin resistance and synaptic dysfunction in intracerebroventricular-streptozotocin injected rodents. Neurobiol Aging. 2012; 33: 430 e5-18.

[49] Hooper C, Markevich V, Plattner F, et al. Glycogen synthase kinase-3 inhibition is integral to long-term potentiation. Eur J Neurosci. 2007; 25: 81-6.

[50] Chiba T, Yamaza H, Shimokawa I. Role of insulin and growth hormone/insulin-like growth factor-I signaling in lifespan extension: rodent longevity models for studying aging and calorie restriction. Curr Genomics. 2007; 8: 423-8.

[51] Kimura KD, Tissenbaum HA, Liu Y, et al. daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in Caenorhabditis elegans. Science. 1997; 277: 942-6.

[52] Samuelson AV, Klimczak RR, Thompson DB, et al. Identification of Caenorhabditis elegans genes regulating longevity using enhanced RNAi-sensitive strains. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2007; 72: 489-97.

[53] Clancy DJ, Gems D, Harshman LG, et al. Extension of life-span by loss of CHICO, a Drosophila insulin receptor substrate protein. Science. 2001; 292: 104-6.

[54] Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. Nature. 2009; 460: 392-5.

[55] Coschigano KT, Holland AN, Riders ME, et al. Deletion, but not antagonism, of the mouse growth hormone receptor results in severely decreased body weights, insulin, and insulin-like growth factor I levels and increased life span. Endocrinology.

2003;144:3799-810.

124

[56] Bartke A. Can growth hormone (GH) accelerate agingEvidencefromGH-transgenicmice. Neuroendocrinology. 2003; 78: 210-6.

[57] Bluher M, Kahn BB, Kahn CR. Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. Science. 2003; 299: 572-4.

[58] Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, et al. IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. Nature. 2003; 421: 182-7.

[59] Selman C, Lingard S, Choudhury AI, et al. Evidence for lifespan extension and delayed age-related biomarkers in insulin receptor substrate 1 null mice. FASEB J. 2008; 22: 807-18.

[60] Taguchi A, Wartschow LM, White MF. Brain IRS2 signaling coordinates life span and nutrient homeostasis. Science. 2007; 317: 369-72.

[61] Ruderman NB, Carling D, Prentki M, et al. AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome. J Clin Invest. 2013; 123: 2764-72.

[62] 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 diabetesJAlzheimersDis. 2005; 7: 63-80.

[63] Fontana L, Klein S. Aging, adiposity, and calorie restriction. JAMA. 2007; 297: 986-94.

[64] Zaia A, Piantanelli L. Insulin receptors in the brain cortex of aging mice. Mech Ageing Dev. 2000; 113: 227-32.

[65] Szoke E, Shrayyef MZ, Messing S, et al. Effect of aging on glucose homeostasis: accelerated deterioration of beta-cell function in individuals with impaired glucose tolerance. Diabetes Care. 2008; 31: 539-43.

[66] Oya J, Nakagami T, Yamamoto Y, et al. Effects of age on insulin resistance and secretion in subjects without diabetes. Intern Med. 2014; 53: 941-7.

[67] Toyoda K, Fukushima M, Mitsui R, et al. Factors responsible for age-related

Elevation in fasting plasma glucose: a cross-sectional study in Japanese men.

125

Metabolism. 2008;57:299-303.

[68] Basu R, Breda E, Oberg AL, et al. Mechanisms of the age-associated deterioration in glucose tolerance: contribution of alterations in insulin secretion, action, and clearance. Diabetes. 2003; 52: 1738-48.

[69] Fan R, Kang Z, He L, et al. Exendin-4 improves blood glucose control in both young and aging normal non-diabetic mice, possible contribution of beta cell independent effects. PLoS One. 2011; 6: e20443.

[70] Irwin N, Green BD, Gault VA, et al. Stable agonist of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) restores pancreatic beta cell glucose responsiveness but not glucose intolerance in aging mice. Exp Gerontol. 2006; 41: 151-6.

[71] Ribeiro RA, Batista TM, Coelho FM, et al. Decreased beta-cell insulin secretory function in aged rats due to impaired Ca(2+) handling. Exp Physiol. 2012; 97: 1065-73.

[72] Convit A, Wolf OT, Tarshish C, et al. Reduced glucose tolerance is associated with poor memory performance and hippocampal atrophy among normal elderly. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100: 2019-22.

[73] Heilbronn LK, de Jonge L, Frisard MI, et al. Effect of 6-month calorie restriction on biomarkers of longevity, metabolic adaptation, and oxidative stress in overweight individuals: a randomized controlled trial. JAMA. 2006; 295: 1539-48.

[74] Anton SD, Karabetian C, Heekin K, et al. Caloric Restriction to Moderate Senescence: Mechanisms and Clinical Utility. Curr Transl Geriatr Exp Gerontol Rep. 2013; 2: 239-46.

[75] Ingram DK, Zhu M, Mamczarz J, et al. Calorie restriction mimetics: an emerging research field. Aging Cell. 2006; 5: 97-108.

[76] Schubert M, Gautam D, Surjo D, et al. Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101: 3100-5.

[77] Varvel NH, Bhaskar K, Kounnas MZ, et al. NSAIDs prevent, but do not reverse,

Neuronal cell cycle reentry in a mouse model of Alzheimer disease. J Clin Invest.

126

2009;119:3692-702.

[78] Talbot K, Wang HY, Kazi H, et al. Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. J Clin Invest. 2012; 122: 1316-38.

[79] Gil-Bea FJ, Solas M, Solomon A, et al. Insulin levels are decreased in the cerebrospinal fluid of women with prodomal Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis. 2010; 22: 405-13.

[80] Bosco D, Fava A, Plastino M, et al. Possible implications of insulin resistance and glucose metabolism in Alzheimer's disease pathogenesis. J Cell Mol Med. 2011; 15: 1807-21.

[81] Zhang YW, Thompson R, Zhang H, et al. APP processing in Alzheimer's disease. Mol Brain. 2011; 4: 3.

[82] Wang X, Yu S, Gao SJ, et al. Insulin inhibits Abeta production through modulation of APP processing in a cellular model of Alzheimer's disease. Neuro Endocrinol Lett. 2014; 35: 224-9.

[83] Son SM, Song H, Byun J, et al. Accumulation of autophagosomes contributes to enhanced amyloidogenic APP processing under insulin-resistant conditions. Autophagy. 2012; 8: 1842-4.

[84] Zhao Z, Xiang Z, Haroutunian V, et al. Insulin degrading enzyme activity selectively decreases in the hippocampal formation of cases at high risk to develop Alzheimer's disease. Neurobiol Aging. 2007; 28: 824-30.

[85] Gasparini L, Gouras GK, Wang R, et al. Stimulation of beta-amyloid precursor protein trafficking by insulin reduces intraneuronal beta-amyloid and requires mitogen-activated protein kinase signaling. J Neurosci. 2001; 21: 2561-70.

[86] Bomfim TR, Forny-Germano L, Sathler LB, et al. An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease-

Associated Abeta oligomers. J Clin Invest. 2012;122:1339-53.

127

[87] Xie L, Helmerhorst E, Taddei K, et al. Alzheimer's beta-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor. J Neurosci. 2002; 22: RC221.

[88] Jolivalt CG, Lee CA, Beiswenger KK, et al. Defective insulin signaling pathway and increased glycogen synthase kinase-3 activity in the brain of diabetic mice: parallels with Alzheimer's disease and correction by insulin. J Neurosci Res. 2008; 86: 3265-74.

[89] Bloemer J, Bhattacharya S, Amin R, et al. Impaired insulin signaling and mechanisms of memory loss. Prog Mol Biol Transl Sci. 2014; 121: 413-49.

[90] Claxton A, Baker LD, Wilkinson CW, et al. Sex and ApoE genotype differences in treatment response to two doses of intranasal insulin in adults with mild cognitive impairment or Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis. 2013; 35: 789-97.

[91] Rodriguez-Rivera J, Denner L, Dineley KT. Rosiglitazone reversal of Tg2576 cognitive deficits is independent of peripheral gluco-regulatory status. Behav Brain Res. 2011; 216: 255-61.

[92] Gupta R, Gupta LK. Improvement in long term and visuo-spatial memory following chronic pioglitazone in mouse model of Alzheimer's disease. Pharmacol Biochem Behav. 2012; 102: 184-90.

128