

基于 Ghrelin 水平调控探讨玉液汤对 2 型糖尿病大鼠 认知障碍的影响

张瑞华¹, 石勇¹, 曹珊珊¹, 王新怡¹, 韩朝军¹, 史永恒¹, 王川¹, 王斌¹, 刘继平^{1,2*}

(1. 陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046;

2. 陕西省中医药管理局中药药效机制与物质基础重点实验室, 陕西 咸阳 712046)

[摘要] 目的:观察玉液汤对 2 型糖尿病认知障碍(DCI)大鼠胃饥饿素(Ghrelin)表达水平的调控,探讨其防治 DCI 的作用途径。方法:以高脂高糖饲料结合链脲佐菌素(STZ)腹腔注射建立 2 型糖尿病大鼠模型,除正常组外,造模成功后按照血糖均匀分模型组、二甲双胍组(200 mg·kg⁻¹)、玉液汤低、中、高剂量组(4.575、9.15、18.3 g·kg⁻¹),每组 10 只。连续灌胃给药 30 d,观察并记录各组大鼠体质量及血糖。给药结束即采用 Morris 水迷宫法测试大鼠学习记忆能力,测试结束后取大鼠全脑进行苏木素-伊红(HE)染色观察海马 CA1 区病理变化,同时以免疫组化法检测胃组织和海马 CA1 区 Ghrelin 的表达。结果:与正常组比较,模型组大鼠血糖显著上升($P<0.01$),体质量显著下降($P<0.01$),水迷宫逃避潜伏期明显增加($P<0.05, P<0.01$),目标区域停留时间及运动路程、穿越平台次数显著下降($P<0.01$),海马 CA1 区细胞形态结构异常,排列紊乱,数量减少,大鼠血清、海马 CA1 区及胃组织 Ghrelin 蛋白表达明显降低($P<0.05, P<0.01$)。与模型组比较,玉液汤中、高剂量组大鼠体质量均增加,各剂量组血糖显著下降($P<0.01$),各组大鼠逃避潜伏期均明显缩短($P<0.05$),目标区域停留时间、运动路程及穿越平台次数均明显增加($P<0.05, P<0.01$),海马 CA1 区细胞结构形态均改善,正常细胞数量增加,血清、胃组织及海马 CA1 区 Ghrelin 水平明显提高($P<0.05, P<0.01$)。结论:玉液汤可有效改善 DCI 大鼠的认知能力,其机制可能与其调节血清、海马 CA1 区及胃组织 Ghrelin 有关。

[关键词] 2 型糖尿病认知障碍(DCI); 玉液汤; 胃饥饿素; 脾胃论治; 诊断标志

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)16-0035-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221204

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220419.1308.005.html>

[网络出版日期] 2022-04-20 16:13

Impact of Yuyetang on Cognitive Impairment of Rats with Type 2 Diabetes Mellitus Based on Regulation of Ghrelin Level

ZHANG Ruihua¹, SHI Yong¹, CAO Shanshan¹, WANG Xinyi¹, HAN Chaojun¹, SHI Yongheng¹,
WANG Chuan¹, WANG Bin¹, LIU Jiping^{1,2*}

(1. College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China;

2. Key Laboratory of Pharmacodynamic Mechanism and Material Basis of Traditional Chinese Medicine (TCM),
Shaanxi Administration of TCM, Xianyang 712046, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the regulatory effect of Yuyetang on Ghrelin level in rats with type 2 diabetes mellitus (T2DM)-induced cognitive impairment (DCI) and explore the pathway in the prevention and treatment of DCI. **Method:** The T2DM model was induced in rats by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) combined with the high-fat and high-sugar diet (STZ). The model rats were divided into model group, metformin group (200 mg·kg⁻¹), and low-, medium-, and high-dose Yuyetang groups(4.575, 9.15, 18.3 g·kg⁻¹)

[收稿日期] 2022-02-25

[基金项目] 陕西省重点研发计划项目(2021SF-072);陕西中医药大学学科创新团队项目(2019-YL13)

[第一作者] 张瑞华,在读硕士,从事中药神经药理学研究,E-mail:772689674@qq.com

[通信作者] * 刘继平,教授,从事中药神经药理学研究,E-mail:liwenjie780711@163.com

according to the blood glucose, with 10 rats in each group. A normal group was also set up. The rats were administered with corresponding drugs by gavage for 30 days, and the body weight and blood glucose of the rats in each group were observed and recorded. After drug intervention, the learning and memory abilities of rats were tested by the Morris water maze. After the test, the whole brains of rats were sampled for hematoxylin-eosin (HE) staining to observe the pathological changes in the hippocampal CA1 region, and the expression of Ghrelin in gastric tissues and hippocampal CA1 region was detected by immunohistochemistry. **Result:** Compared with the normal group, the model group showed increased blood glucose ($P<0.01$), reduced body weight ($P<0.01$), prolonged escape latency ($P<0.05$, $P<0.01$), shortened retention time and movement distance in the target area, decreased number of platform crossings ($P<0.01$), abnormal morphology and structure of cells with disordered arrangement and reduced number in the hippocampal CA1 region, and decreased expression of Ghrelin in the serum, hippocampal CA1 region, and gastric tissues ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the model group, the medium- and high-dose Yuyetang groups showed increased body weight, while all Yuyetang groups showed reduced blood glucose ($P<0.01$), shortened escape latency ($P<0.05$), prolonged retention time and movement distance in the target area, increased platform crossings ($P<0.05$, $P<0.01$), improved morphology and structure of cells, increased number of normal cell in the hippocampal CA1 region, and elevated Ghrelin levels in the serum, gastric tissues, and hippocampal CA1 region ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** Yuyetang can effectively improve the cognitive ability of DCI rats, and its mechanism may be related to the regulation of Ghrelin levels in the serum, hippocampal CA1 region, and gastric tissues.

[Keywords] type 2 diabetes mellitus-induced cognitive impairment (DCI); Yuyetang; Ghrelin; treatment based on spleen and stomach; diagnostic standard

糖尿病认知障碍(DCI)是糖尿病并发脑病的主要表现,为持续的高血糖状态导致的神经、微血管病变之一。随病程延长,发展为阿尔茨海默病的几率明显增加。数据分析显示,在全球阿尔茨海默病(AD)患者中,糖尿病人占90%~95%,这不仅增加了经济负担,同时也加重了社会管理负担^[1]。DCI已是全球关注的热点疾病,由于其属于内分泌与神经合并症,病理机制复杂,迄今仍未有确切的DCI诊断标志物及治愈性药物出现。因此寻找有效防治DCI的治疗途径及药物具有重要意义。

胃饥饿素(Ghrelin),又叫生长激素释放肽,是由胃X/A样细胞分泌的一类脑肠肽激素,其酰化型可与生长激素促分泌素受体1 α (GHS-R1 α)结合调节摄食行为^[2]。一些实验研究显示,Ghrelin不仅具有葡萄糖和能量稳态力,还参与大脑保护作用,如修复血脑屏障、降低神经炎症、调节神经因子代谢紊乱,改善脑氧化应激等^[3-4]。Ghrelin在某些病理状态下会减少,且已有报道证明,通过中医药调节Ghrelin表达可间接性的起到脑保护作用^[5-6]。因此,从Ghrelin水平调控探究中药(复方)干预DCI大鼠的作用机制对其开发治疗药物具创新性意义。DCI的中医病机复杂,证型多样,论治多从脾、肾二脏入手^[7],而“脾为后天之本”,更符合中医对2型糖尿病

发病机理的认识。因此笔者以脾胃为主脏腑展开探讨。玉液汤出于张锡纯所撰《医学衷中参西录》,以补脾固肾发挥其益气养阴,生津止渴之效,是中医临床治疗消渴的名方,本课题组基于组方药味分析及预实验,发现该方对DCI有一定改善作用,但作用机制不清,因此本研究根据玉液汤的作用特点,结合脾脑相关基础理论,观察其对DCI大鼠血清、胃组织和大脑海马CA1区Ghrelin水平的影响,探讨中医药干预DCI的肠脑轴机制,以期对DCI的诊断和防治提供新思路。

1 材料

1.1 动物 此实验选取SPF级雄性SD大鼠70只,8周龄,体质量200~220 g,由成都达硕实验动物有限公司提供,动物合格证号SCXK(川)2020-030,于陕西中医药大学中药药理实验室动物房饲养,动物使用许可证号SYXK(陕)2017-004。本研究中实验动物获得陕西中医药大学动物伦理委员会批准同意(审查备案编号SUCMDL2019305001)。

1.2 药物 玉液汤根据《医学衷中参西录》原书记载的药物剂量比进行配伍:生山药一两(30 g),生黄芪五钱(15 g)、葛根一钱半(4.5 g)、天花粉三钱(9 g)(陕西惠福药业有限公司,批号分别为210901、210102、200701、200701),知母六钱(18 g)、生鸡内

金(捣细)二钱(6 g)、五味子三钱(9 g)(陕西兴盛德药业有限公司,批号分别为20210308、20210308、20210308),饮片均购于陕西中医药大学附属医院,经陕西中医药大学药学院中药鉴定教研室颜永刚教授鉴定为正品。盐酸二甲双胍片(中美上海施贵宝,批号ABV1015)。

1.3 试剂 链脲佐菌素(STZ,美国Sigma公司,货号S0130),苏木素-伊红(HE)染液、山羊抗兔二抗、DAB显色试剂盒(Serbicebio公司,批号分别为G1003、G1209、G1211),Ghrelin试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号ml059461),Ghrelin抗体(武汉塞维尔生物科技有限公司,批号GB11548)。

1.4 仪器 水迷宫视频分析系统(上海吉量软件科技有限公司);RM2016型病理切片机、ICC50 W型光学显微镜(德国徕卡仪器有限公司),Donatello型脱水机(意大利Diapath公司);JB-P5型包埋机(武汉俊杰电子有限公司);罗氏血糖仪(瑞士罗氏公司)。

2 方法

2.1 药物煎煮及配置 玉液汤总方91.5 g,按照人体质量60 kg换算大鼠等效剂量为 $9.15 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,作中剂量组,同时设定低剂量组 $4.575 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、高剂量组 $18.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。除鸡内金外,方中其他饮片按剂量比,加10倍量的水浸泡40 min,用煎药砂锅武火煮沸后转文火慢煎1 h,趁热过滤,滤渣加8倍量水,武火煮沸,文火慢煎40 min。合并滤液,分别减压浓缩药液为0.428、0.854、 $1.71 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 质量浓度。鸡内金粉末于临用前加入使分别配成0.457 5、0.915、 $1.83 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 混悬液灌胃用。盐酸二甲双胍经碾碎后配成 $0.02 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液。

2.2 动物模型制备 参考文献[8]方法,SD大鼠适应性喂养7 d,预留10只大鼠做正常组,其余大鼠喂养自制高脂高糖饲料(基础饲料59%,白砂糖20%,猪油18%,鸡蛋黄3%)30 d。1个月后腹腔注射STZ($35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),正常组注射预冷的柠檬酸缓冲液。72 h后尾尖静脉取血,检测各个大鼠空腹血糖,以空腹血糖 $>16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 视为造模成功,不达标者补打STZ,至所有动物血糖均达标并稳定后继续喂养高脂高糖饲料2个月,水迷宫试验筛选认知障碍大鼠,成模率为85.7%。

2.3 动物分组及给药 DCI造模成功的大鼠随机分为模型组,盐酸二甲双胍组($200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、玉液汤组(4.575 、 9.15 、 $18.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。正常及模型组灌胃等体积生理盐水,其余各组灌胃相应药物,灌胃容

积 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,连续灌胃30 d。实验期间,每日观察大鼠精神状态、进食和饮水情况。

2.4 水迷宫行为学实验 给药30 d后,采用Morris水迷宫实验测试2型糖尿病大鼠空间学习记忆能力。先进行定位航行实验,在水池中设立一平台,使每只大鼠头面向池壁,分别从水池的4个标记点放入水中,记录其90 s内寻找平台所需时间(逃避潜伏期),若初次实验大鼠在设定时间内没有找到平台,将其引导至平台10 s,记其潜伏期为90 s。定位航行实验持续5 d,于第6天撤去平台进行空间探索实验,任选一标记点将大鼠放入水中,实验期间继续给药。

2.5 样本收集 末次行为学测试结束后,所有大鼠禁食12 h,不禁水,各组大鼠以10%水合氯醛腹腔注射麻醉,腹主动脉取血。每组各取3只,开胸暴露心脏,从左心房扎入灌流针,剪开右心耳,以生理盐水冲洗,待肝脏与肺血色褪去变白后,再以4%多聚甲醛灌注固定,固定充分后,断头取脑;同时打开腹腔剪取整个胃体,将胃体沿胃大弯剪开,去除内容物,胃体清洗干净,将脑与胃固定于4%多聚甲醛中,常温保存。

2.5.1 血清 Ghrelin 检测 将新鲜采集的血液静置30 min, $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心15 min(离心半径15.7 cm)。分离血清,以酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测大鼠血清 Ghrelin 的含量。

2.5.2 HE 染色观察 各组大鼠海马CA1区组织细胞形态变化 取固定24 h以上的脑组织样本脱水、透明,石蜡包埋,冠状切片,片厚 $4 \mu\text{m}$,脱蜡,苏木素染色3~5 min,自来水洗,返蓝,脱水,伊红染色5 min,脱水,透明,中性树胶封片,显微镜下观察各组大鼠海马CA1区组织细胞形态和数目变化。

2.5.3 免疫组化法检测组织 Ghrelin 的表达 取固定24 h以上的组织样本,制作石蜡切片,片厚 $4 \mu\text{m}$ 。石蜡切片脱水,柠檬酸缓冲液(pH 6.0)中修复抗原;3% H_2O_2 溶液,室温避光孵育25 min,以3% BSA室温封闭30 min,滴加一抗 Ghrelin(1:800), $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜,滴加二抗(1:800)室温孵育50 min, PBS漂洗3次, DAB显色,苏木素复染,脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。选取各组样本同一部位的3个不重复的高倍视野,以棕黄色颗粒为阳性细胞表达,使用Image-Pro Plus 6.0图像分析软件进行半定量分析,计算每张切片阳性染色部分平均积分吸光度IA。

2.6 统计学分析 采用SPSS 26.0进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析

(One-way ANOVA), 方差齐时, 组间均值两两比较采用图基(Turky)法; 若方差不齐则使用非参数检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 DCI 大鼠体质量与血糖的影响 与正常组比较, 模型组体质量明显下降, 血糖显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 玉液汤各组均能降低大鼠血糖, 且中、高剂量组效果更为显著 ($P < 0.01$); 玉液汤低、中、高剂量组均能使大鼠体质量下降幅度减轻, 但组间差异无统计学意义。见表 1。

3.2 对 DCI 大鼠行为学的影响 与正常组比较, 模型组大鼠逃避潜伏期于第 4 天、第 5 天显著延长 ($P < 0.01$), 目标区域停留时间及运动路程显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 玉液汤各组均能缩短大鼠逃

表 1 玉液汤对 DCI 大鼠体质量及血糖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Effect of Yuyetang on body weight and blood sugar in DCI rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	体质量/g	血糖/mmol·L ⁻¹
正常组		484.6±35.6	6.04±0.46
模型组		338±35.5 ¹⁾	29.61±1.96 ¹⁾
二甲双胍组	0.2	369.7±37.5	17.56±2.80 ²⁾
玉液汤低剂量组	4.575	350.9±22.53	22.61±2.87
玉液汤中剂量组	9.15	352.7±25.90	19.72±2.19 ²⁾
玉液汤高剂量组	18.3	353.7±19.10	19.19±3.77 ²⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.01$

避潜伏期, 增加穿越平台次数, 目标区域停留时间及运动路程, 以玉液汤高剂量组效果最好 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2 和表 3。

表 2 玉液汤对 DCI 大鼠在 Morris 测试中逃避潜伏期的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of Yuyetang on escape latency of DCI rats in Morris test ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
正常组		77.37±21.48	48.25±13.29	36.18±14.87	23.72±12.65	18.59±8.64
模型组		89.57±4.54	82.94±13.52 ¹⁾	72.34±14.87 ¹⁾	62.05±16.16 ²⁾	56.58±16.44 ²⁾
二甲双胍组	0.2	81.64±10.87	67.28±21.09	39.90±29.91 ³⁾	35.19±20.93 ³⁾	27.24±16.70 ⁴⁾
玉液汤低剂量组	4.575	88.28±4.38	65.23±29.99	55.62±29.62	47.04±21.82	35.31±15.37 ³⁾
玉液汤中剂量组	9.15	78.58±18.80	64.52±19.56	53.88±20.07	45.96±18.80	35.10±10.24 ³⁾
玉液汤高剂量组	18.3	78.43±14.27	46.95±30.76	39.92±18.97 ³⁾	38.01±16.05 ³⁾	27.80±15.21 ³⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05, ^2)P < 0.01$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.05, ^4)P < 0.01$ (表 5 同)

表 3 玉液汤对 DCI 大鼠在 Morris 测试中空间探索的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Effect of Yuyetang on space exploration of DCI rats in Morris test ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	目标区域停留时间/s	目标区域运动路程/mm	穿越平台次数/次
正常组		13.48±2.93	658.05±43.75	2.80±0.71
模型组		4.57±1.95 ¹⁾	551.36±21.97 ¹⁾	0.75±0.59 ¹⁾
二甲双胍组	0.2	8.57±1.62	602.41±40.73	1.75±0.79 ²⁾
玉液汤低剂量组	4.575	7.77±3.45	613.15±45.86 ²⁾	1.75±0.82 ²⁾
玉液汤中剂量组	9.15	9.62±1.47 ²⁾	615.62±55.93 ²⁾	1.85±0.78 ²⁾
玉液汤高剂量组	18.3	9.63±3.47 ³⁾	628.40±38.72 ³⁾	2.50±0.62 ³⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05, ^3)P < 0.01$ (表 4 同)

3.3 对 DCI 大鼠血清 Ghrelin 表达的影响 与正常组比较, 模型组大鼠血清 Ghrelin 水平显著下降 ($P < 0.01$), 玉液汤各组均能提高大鼠血清 Ghrelin 水平, 以高剂量组最优 ($P < 0.01$)。见表 4。

3.4 对 DCI 大鼠海马 CA1 区病理形态学变化的影响 正常组大鼠海马神经细胞结构均一, 形态圆

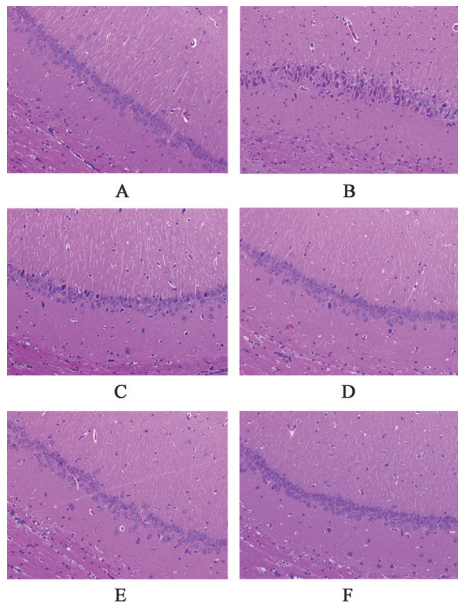
表 4 玉液汤对 DCI 大鼠血清 Ghrelin 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 4 Effect of Yuyetang on level of serum Ghrelin in DCI rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	血清 Ghrelin/ng·L ⁻¹
正常组		855.85±14.04
模型组		823.81±16.73 ¹⁾
二甲双胍组	0.2	849.50±23.91 ²⁾
玉液汤低剂量组	4.575	832.91±21.30
玉液汤中剂量组	9.15	840.26±15.49 ²⁾
玉液汤高剂量组	18.3	899.15±18.86 ³⁾

润, 数量较多, 排列整齐, 细胞核清晰可见, 与正常组比较, 模型组大鼠正常的海马神经元数量减少, 形态多变为三角形, 胞核颜色变深, 排列散在。经玉液汤干预后, 大鼠神经细胞胞核固缩少见, 随着剂量增加, 正常细胞数量增多, 排列整齐, 胞核渐明显。见图 1。

3.5 对 DCI 大鼠海马 CA1 区 Ghrelin 表达的影响 正常组大鼠海马阳性细胞数量较多, 染色较深且均一; 与正常组比较, 模型组大鼠阳性细胞数显著



注:A.正常组;B.模型组;C.二甲双胍 $0.2\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;D.玉液汤低剂量组;E.玉液汤中剂量组;F.玉液汤高剂量组(图2和图3同)

图1 玉液汤对DCI大鼠海马CA1区病理变化的影响(HE, $\times 200$)
Fig. 1 Effect of Yuyetang on pathological changes in hippocampal CA1 area of DCI rats (HE, $\times 200$)

减少($P<0.01$),无明显的深染胞核;玉液汤干预后,大鼠海马CA1区阳性细胞染色明显增加,染色细胞数增加且均一,玉液汤中、高剂量组干预更加明显($P<0.05, P<0.01$)。见图2、表5。

3.6 对DCI大鼠胃组织 Ghrelin 表达的影响 正常

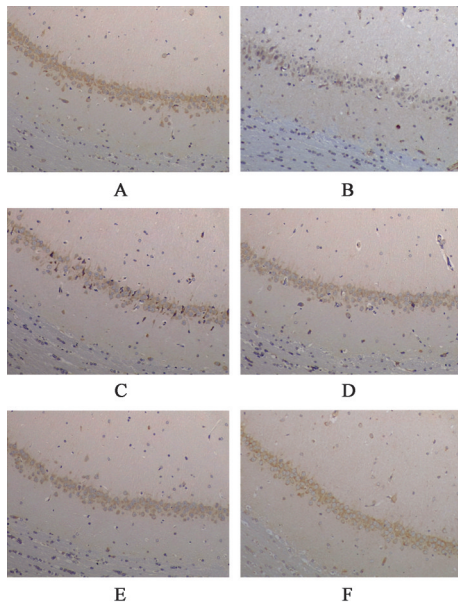


图2 玉液汤对DCI大鼠海马CA1区 Ghrelin 表达的影响(免疫组化, $\times 200$)

Fig. 2 Effect of Yuyetang on expression of Ghrelin in hippocampal CA1 area of DCI rats (IHC, $\times 200$)

组胃组织可见明显的棕色颗粒,与正常组比较,模型组明显的阳性表达($P<0.05$);与模型组比较,经玉液汤干预后,随剂量增加,胃组织渐显深染的阳性细胞,玉液汤高剂量组干预更加显著($P<0.05, P<0.01$)。见图3、表5。

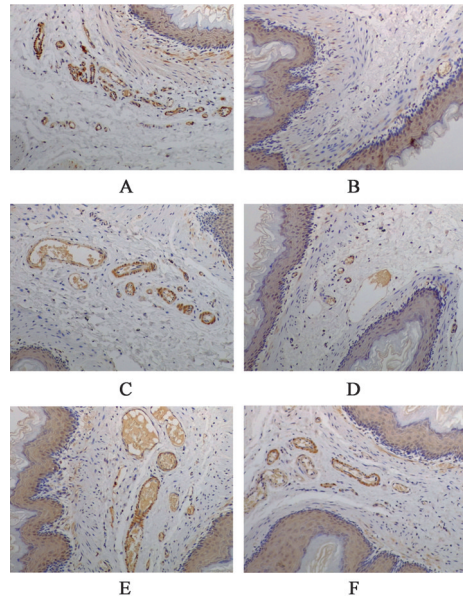


图3 玉液汤对DCI大鼠胃组织 Ghrelin 表达的影响(免疫组化, $\times 200$)

Fig. 3 Effect of Yuyetang on expression of Ghrelin in stomach tissue of DCI rats (IHC, $\times 200$)

表5 玉液汤对DCI大鼠胃组织及海马CA1区 Ghrelin 表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Yuyetang on grey expression of Ghrelin in stomach tissue and hippocampal CA1 area of DCI rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	胃组织	海马CA1区
正常组		0.148 ± 0.049	0.161 ± 0.015
模型组		$0.037\pm 0.019^{1)}$	$0.077\pm 0.025^{2)}$
二甲双胍组	0.2	0.092 ± 0.033	$0.133\pm 0.012^{3)}$
玉液汤低剂量组	4.575	0.059 ± 0.014	0.108 ± 0.022
玉液汤中剂量组	9.15	0.098 ± 0.035	$0.144\pm 0.026^{3)}$
玉液汤高剂量组	18.3	$0.139\pm 0.008^{3)}$	$0.154\pm 0.027^{4)}$

4 讨论

DCI是由持续的高血糖引发的糖尿病并发症,临床多以降血糖为主要治疗对策。中医将DCI归属为“消渴”“健忘”“呆症”范畴,如《圣济总录》云:“消渴病……健忘怔忡,筋骨羸劣。”DCI发病于脑,主起于心、脾、肝、肾四脏,以阴虚燥热、毒瘀阻络为主证型^[9]。作为代谢紊乱性疾病,DCI与五脏气机失调密切相关,而脾胃为气机枢纽,是治疗五脏病的中心环节^[10-11]。《温病条辨》记载:“脾胃之病,有伤

脾阳,有伤脾阴。脾阴虚者,脾血消耗,虚火上炎……脾阴不足,水谷不化,气血无以生……脑髓不得养,脑髓空而致。”可见,从脾论治不仅是消渴症最提倡的方法,也是充养脑髓最有力的手段^[12]。

基于“起于中焦而极于上下”的理念,张锡纯创制了消渴名方——玉液汤^[13]。其书《医学衷中参西录》论玉液汤主治气不布津、肾虚胃燥之消渴。方中黄芪大补元气为君,得葛根能升元气;佐以山药、知母、天花粉,使阳升而阴应;鸡内金化饮食中糖质为津液,强健脾胃;五味子酸收之性固肾,减缓水饮下趋。现代药理研究显示,在治疗糖尿病方面,黄芪、山药、知母、葛根中的多糖、皂苷、黄酮类成分不同程度降低血糖、改善胰岛素抵抗;鸡内金中的蛋白质和微量元素增加胃肠蠕动,降低血液粘稠度;五味子提取物能提高小鼠糖耐量;天花粉丙酮分级沉淀粗提物可改善DM的脂代谢紊乱^[14]。另外,葛根知母药对可显著改善DCI模型鼠的记忆,干预DM所致海马进一步损伤^[15-17]。综合古今,益气生津,润燥止渴的玉液汤在干预DCI的发生发展中能够发挥重要作用。

Ghrelin是含有28个氨基酸的多肽,最早由KOJIMA等^[18]发现是生长激素分泌受体(GHS-R)唯一的内源性配体^[18]。由胃底的X/A样细胞分泌,在胃腺部大弯和小弯含量最高^[19-20]。Ghrelin与其受体结合,可发挥大多数生物学效应。众所周知,肥胖与代谢紊乱关系密切,而Ghrelin能通过机体免疫系统功能调节,降低组织炎症而维持组织稳态,这在中枢免疫也具同样作用;相反,抑制Ghrelin信号会加重饮食诱导的肥胖症及胰岛素抵抗^[21-22]。Ghrelin虽产生于胃,但能通过血液循环、透过血脑屏障发挥中枢作用^[23]。如通过降低神经炎症、增加海马神经发生及突触可塑性等改善认知^[24];在海马部位,Ghrelin与其受体不同程度的增加亦可共同参与记忆巩固过程^[25]。同时体外实验说明,其通过干预Tau蛋白异常磷酸化、减轻糖代谢和胰岛素抵抗保护海马神经元^[26];可抑制细胞毒所致的细胞凋亡保护神经细胞^[27],由此可见,Ghrelin在改善代谢和认知上均具关键作用。另有临床研究显示,阿尔茨海默病患者的血清里表现较低的Ghrelin水平,因此,Ghrelin不仅有望成为治疗DCI的新靶点,也对DCI的诊断具创新意义^[28]。

本实验以高脂高糖饲料喂养结合STZ注射诱导的2型糖尿病大鼠为研究对象,结果显示给药组大鼠体质量增加,血糖降低,血清Ghrelin水平增加,

胃组织和海马CA1区Ghrelin表达增加,且玉液汤组效果优于二甲双胍组。可见,玉液汤发挥其养阴、生津、止渴之效可降低DCI大鼠的血糖,改善认知能力,可能与其上调血清、胃组织及海马CA1区Ghrelin表达有关。

综上所述,玉液汤可通过调节Ghrelin的水平延缓DCI大鼠病程发展。本研究以内源性脑肠肽Ghrelin作为中医药和疾病之间的关键枢纽,从脾胃论治玉液汤干预DCI的作用效果,正符合了中药现代化的内涵。另外,最新数据挖掘发现,神经配体-受体通路参与了玉液汤对2型糖尿病的作用,对此实验研究具支撑作用^[29]。本实验发现正常组的血清Ghrelin低于玉液汤高剂量组,然而Ghrelin也与肥胖相关,正常机体状态下,适当的热量限制表现较高的Ghrelin,从而增加新生海马神经元的数量^[30],因此正常鼠的体质量可能为Ghrelin水平的一个影响因素,这值得进一步思考。另外,本实验后续将进一步探究玉液汤是以何种方式调节胃与脑Ghrelin的含量,为中医药-脑肠肽-疾病之间的具体作用方式完善理论依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] SRIKANTH V, SINCLAIR A J, HILL-BRIGGS F, et al. Type 2 diabetes and cognitive dysfunction-towards effective management of both comorbidities [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2020, 8(6): 535-545.
- [2] HOWICK K, GRIFFIN B T, CRYAN J F, et al. From belly to brain: Targeting the ghrelin receptor in appetite and food intake regulation [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(2): 273.
- [3] LOPEZ N E, KRZYZANIAK M J, BLOW C, et al. Ghrelin prevents disruption of the blood-brain barrier after traumatic brain injury [J]. *J Neurotrauma*, 2012, 29(2): 385-393.
- [4] ZHAO Y, SHEN Z, ZHANG D, et al. Ghrelin ameliorates nerve growth factor Dysmetabolism and inflammation in STZ-induced diabetic rats [J]. *Metab Brain Dis*, 2017, 32(3): 903-912.
- [5] 郝彦伟,李斌,张怡,等. 基于脑肠肽Ghrelin水平探讨远志散对AD大鼠学习记忆能力及进食量的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(21): 8-14.
- [6] 白敏,段永强,李能莲,等. 基于脑肠肽四君子汤对脾气虚证大鼠运化功能以及学习记忆功能的影响 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37(13): 1696-1699.
- [7] 李庆利,杨文明. 2型糖尿病认知功能障碍中医证候

- 特点研究[C]//中国中西医结合学会养生学与康复医学专业委员会委员会议暨第七次学术研讨会论文集. 大连:[出版者不详],2011:160-166.
- [8] KAMDI S P, BADWAIK H R, RAVAL A, et al. Ameliorative potential of phloridzin in type 2 diabetes-induced memory deficits in rats[J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 913:174645.
- [9] 战丽彬,周妍,林海燕,等. 2型糖尿病轻度认知功能障碍的中医证候研究[J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29(12):3759-3762.
- [10] 秘红英,宋红霞,李雅文,等. 从“五脏之气”探讨代谢综合征的发病机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(18):175-178.
- [11] 王子欣. 仲景从脾胃论治五脏病思想的研究[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学, 2021.
- [12] 王尧尧. 中医从脾论治消渴病研究进展[J]. *中医临床研究*, 2020, 12(17):137-140.
- [13] 王璐,张文凤. 张锡纯论治消渴的学术思想探微[J]. *长春中医药大学学报*, 2020, 36(3):412-414.
- [14] 李文东,田风胜,吕树泉. 玉液汤药物配伍的现代药理研究探要[J]. *实用中医内科杂志*, 2011, 25(2):3-5.
- [15] 韩莉花,袁欣,杨真儿,等. 葛根知母药对调控HMGB1/RAGE/NF- κ B通路改善糖尿病大鼠认知障碍[J]. *中药药理与临床*, 2020, 36(1):124-130.
- [16] 焦素杰,冯晓,张娜. 玉液汤对2型糖尿病合并颈动脉粥样硬化的影响[J]. *世界中医药*, 2021, 16(4):638-642.
- [17] 赵志祥,简小兵,王文英. 玉液汤对2型糖尿病肥胖患者肠道菌群及脂质代谢的影响[J]. *世界中医药*, 2020, 15(19):2959-2962.
- [18] KOJIMA M, HOSODA H, DATE Y, et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach[J]. *Nature*, 1999, 402(6762):656-660.
- [19] DATE Y, KOJIMA M, HOSODA H, et al. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans [J]. *Endocrinology*, 2000, 141(11):4255-4261.
- [20] LI J, YI S Q, WANG H X, et al. Immunolocalization of ghrelin in the stomach of Sprague-Dawley rat[J]. *Anat Histol Embryol*, 2011, 40(2):95-99.
- [21] DOVE A, SHANG Y, XU W, et al. The impact of diabetes on cognitive impairment and its progression to dementia[J]. *Alzheimers Dement*, 2021, 17(11):1769-1778.
- [22] MA X, LIN L, YUE J, et al. Suppression of Ghrelin exacerbates HFCS-induced adiposity and insulin resistance[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(6):1302.
- [23] RHEA E M, SALAMEH T S, GRAY S, et al. Ghrelin transport across the blood-brain barrier can occur independently of the growth hormone secretagogue receptor[J]. *Mol Metab*, 2018, 18:88-96.
- [24] KIM C, KIM S, PARK S. Neurogenic effects of ghrelin on the hippocampus [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(3):588.
- [25] BEHESHTI S, DEHESTANI H. Differential expression levels of the hippocampal ghrelin and its receptor mRNA during memory consolidation [J]. *Behav Brain Res*, 2021, 408:113270.
- [26] 陈颖. Ghrelin对高糖诱导的海马神经细胞tau蛋白磷酸化和糖代谢的影响及机制研究[D]. 沈阳:中国医科大学, 2010.
- [27] HE X, YUAN W, YANG C Q, et al. Ghrelin alleviates 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells [J]. *Neural Regen Res*, 2022, 17(1):170-177.
- [28] 黄澈. 胃饥饿素在老年阿尔茨海默病患者炎症因子调控中的途径和作用探讨[J]. *中国疗养医学*, 2019, 28(8):789-791.
- [29] 刘坚辉,陈楚仪,杨伟勋,等. 基于网络药理学探析玉液汤对2型糖尿病的作用机制[J]. *中成药*, 2021, 43(9):2534-2539.
- [30] DAVIES J S. Ghrelin mediated hippocampal neurogenesis[J]. *Vitam Horm*, 2022, 118:337-367.

[责任编辑 周冰冰]