

· 药理 ·

人参皂苷 Rb₁ 和罗格列酮联合用药 对 2 型糖尿病痴呆小鼠记忆功能的影响及机制

毛黎黎¹, 高晓斐¹, 孙子微¹, 杨玉玲¹, 岳仁宋^{2*}

(1. 成都中医药大学, 成都 610072; 2. 成都中医药大学附属医院, 成都 610072)

[摘要] **目的:** 研究人参皂苷 Rb₁ 和罗格列酮联合用药对 2 型糖尿病记忆障碍小鼠动物学习记忆能力及胰岛素信号通路的影响。**方法:** 雄性 10 周龄 C57BL 小鼠 16 只为正常组(N 组), 雄性 10 周龄 Kkay 小鼠 64 只为模型组, 高糖高脂饲料喂养 6 周后, 检测随机血糖 $\geq 13.9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 后随机分为模型组(M 组)、阳性组(P 组)、联合给药高、中、低剂量组(C1, C2, C3 组)。P 组每天用马来酸罗格列酮片按 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃, C 组每天用马来酸罗格列酮片 ($3.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和人参皂苷 Rb₁ ($60, 30, 15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 灌胃, N 组和 M 组每天用等体积生理盐水灌胃, 持续 42 d。给药前后分别进行 1 次 Morris 水迷宫试验, 记录结果并做比较。水迷宫后及时于冰上开颅取海马。采用酶联免疫吸附剂测定(ELISA)小鼠血浆胰岛素水平; 半定量反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测小鼠大脑海马中 1-磷脂酰肌醇-3 激酶亚基 p85(PI-3K/p85)的信使核糖核酸(mRNA)表达水平。**结果:** 与正常组相比, 模型组在水迷宫试验中寻找平台的时间及错误率明显偏高($P < 0.05$), 血浆胰岛素水平和 PI-3K/p85 水平均明显升高($P < 0.05$); 与模型组相比, 罗格列酮组与之各项指标差异均不明显, 复合给药组平台潜伏期均明显降低($P < 0.05$), 血浆胰岛素水平和 PI-3K/p85 水平均明显降低($P < 0.05$)。**结论:** 人参皂苷 Rb₁ 能在改善血浆胰岛素水平的基础上, 有效提高胰岛素抵抗型糖尿病记忆障碍小鼠学习、记忆能力, 其可能的作用机制为通过降低 PI-3K/p85 表达水平改善大脑海马胰岛素信号传导通路。

[关键词] 人参皂苷; 糖尿病性记忆障碍; 血浆胰岛素水平; 1-磷脂酰肌醇-3 激酶亚基 p85; 胰岛素信号传导通路

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)24-0130-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014240130

Effect and Mechanism of Ginsenosides Rb₁ and Rosiglitazone on Ethology and Insulin Signaling Pathway of Type 2 Diabetes Mice with Cognitive Impairment

MAO Li-li¹, GAO Xiao-fei¹, SUN Zi-wei¹, YANG Yu-ling¹, YUE Ren-song^{2*}

(1. Chengdu University Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 610072, China;

2. Affiliated Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu 610072, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect and mechanism of ginsenosides Rb₁ on memory impairment of type 2 diabetes. **Method:** Sixteen 10-week C57BL mice were as normal group (N group) and 64 Kkay mice 10-week with high blood sugar ($\geq 13.9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) as model group (M group), positive group (P group) and composite group with high, middle and low doses (C1, C2, C3 group). Fed the positive group was given rosiglitazone maleate tablets ($3.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), and composite group was given rosiglitazone maleate tablets ($3.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) and ginsenosides Rb₁ ($60, 30, 15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). Normal and model groups were given equal volume of saline. After two Morris water mazes, samples were collected and enzyme-linked immunosorbant assay

[收稿日期] 20140619(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072775)

[第一作者] 毛黎黎, 硕士在读, 从事中医药防治内分泌代谢疾病研究, Tel:13541247027, E-mail:156744682@qq.com

[通讯作者] *岳仁宋, 教授, 博士生导师, 从事中医药防治内分泌代谢疾病研究, Tel:18980880163, E-mail:1580229694@qq.com

(ELISA) method was used to test plasma insulin and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to test 1-phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3K)/p85. **Result:** Compared with normal group, model group used much longer time to find the plat ($P < 0.05$), had more active plasma insulin and PI-3K/p85 ($P < 0.05$). Compared with control group, there was no significant differences in positive group, while plasma insulin and PI-3K/p85 were contrary in composite group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Ginsenosides Rb₁ can improve the study and memory level of type 2 diabetes mice with cognitive impairment based on the reducing of plasma insulin, and the possible mechanism may reduce the level of PI-3K/p85.

[Key words] ginsenosides Rb₁; 2 diabetes memory impairment; plasma insulin level; PI-3K/p85; insulin signaling pathway

人参在我国的应用已有两千多年历史。长期研究表明,人参及其主要活性成分具有抗疲劳、扩血管、改善记忆力、调节机体功能稳态^[1]等多方面的作用。早在汉代,张仲景的《伤寒论》中就已提出用人参配以其他药物治疗消渴之证,此后人参成为古方中治疗糖尿病的重要药物。人参皂苷 Rb₁ 是人参根的主要单体成分之一,经研究证实,其能通过改善脑缺血^[2]、抑制神经元细胞凋亡^[3]、维持神经元微管结构的稳定、干扰 β -淀粉蛋白的形成和沉积^[4]等作用,有效改善智力,提高学习记忆功能^[5],但具体作用机制尚未明确。本研究在已建立的成熟胰岛素抵抗型糖尿病记忆功能障碍模型的基础上,进一步探索并明确人参皂苷 Rb₁ 对胰岛素抵抗型糖尿病性记忆障碍和大脑胰岛素信号传导通路的影响及其作用机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 10 周龄 C57BL 小鼠 18 只,基础饲料喂养;雄性 10 周龄 Kkay 小鼠 64 只,高脂高糖饲料(10% 蔗糖、10% 脂肪、基础饲料)喂养,均由中国医学科学院实验动物研究所提供,合格证号 SCXK(京) 2009-0004。

1.2 药物与试剂 人参皂苷 Rb₁ (批号 MUST-12102301,纯度 $\geq 99.8\%$,HPLC,成都广海科技有限公司),马来酸罗格列酮片[批号 H20020475,葛兰素史克(天津)有限公司],酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒(RD 公司)。RT-PCR 引物设计为上海生工,试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.3 仪器 One-Touch-II 快速血糖仪及血糖试纸(美国强生公司),恒温水浴箱(上海比朗仪器),电热恒温水箱(余姚市东方电工仪器厂),酶标仪(美国 BIO-TEK),微量震荡器(无锡县金城仪器厂),移液枪(Eppendorf 公司,法国),快速混匀器(姜堰市新康医疗器械有限公司),高速离心机(Eppendorf 公司,德国)。PCR 仪(美国 ABI 公司),电泳仪、电泳

槽、全自动凝胶成像系统、核酸蛋白测定仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 模型制备及分组、给药 C57BL 小鼠为正常对照组(N 组)高糖高脂饲料喂养 Kkay 小鼠 6 周后测随机血糖 $\geq 13.9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 后按血糖水平随机分为模型组(M 组)、阳性药组(P 组)和联合给药高、中、低剂量组(C1, C2, C3 组),每组 16 只。自由摄食及饮水,取材前禁食 12 h,温度(23 ± 2) °C,湿度 26% ~ 29%,每周检测体重、血糖。P 组用马来酸罗格列酮片 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ ig}$,C 组用马来酸罗格列酮片($3.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)和人参皂苷 Rb₁ (60, 30, 15 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) ig ,N 组和 M 组用等体积生理盐水 ig , ig 持续 42 d。每周 1 次断尾取血法监测血糖。

2.2 Morris 水迷宫试验 实验动物于分组前及给药后共进行 2 次水迷宫试验,前 4 d 为隐藏平台试验,第 5 天为空间搜索试验。第 1 ~ 4 天于第四象限放置平台,将小鼠在第一、二、三象限方向分别投入水中,保持头向迷宫壁入水。每次限定时间 90 s,若小鼠找到平台,使之于平台休息 30 s;如 90 s 未找到平台,将小鼠捞起并放于平台休息 30 s,并将时间记录为 90 s;随后移出迷宫,休息 30 s 后进行下一次实验。第 5 天水迷宫准备同前,但将平台撤除,将小鼠头向与平台象限相背的象限(第一象限)迷宫壁的中点投入水中 90 s,记录小鼠在 90 s 内寻找平台象限的时间。数据采集及图像分析均由图像自动监视和处理系统完成。

2.3 取材及检测

2.3.1 血浆胰岛素水平 行为学试验结束后,每组抽签法选取 8 只小鼠用 10% 水合氯醛按 $3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ ip}$ 麻醉,行眶周静脉取血。室温静置 30 min,4 °C 离心,3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,5 min,取血浆。采用酶联免疫吸附法测定小鼠血浆胰岛素水平。

2.3.2 RT-PCR 样本 水迷宫试验结束后,每组抽

釜法选取 8 只小鼠,0.1% 去乙酰头孢菌素 C(0.1% DCPC) 溶液处理并高压蒸气消毒相关手术器械,3.5% 水合氯醛按 $3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ip 麻醉后无菌操作开颅取海马、大脑额叶皮质,预冷的 0.1% DCPC 溶液冲洗,称重,置备 RT-PCR 样品。

2.3.3 PI-3K/p85 mRNA 表达水平 采用半定量 RT-PCR 检测 PI-3K 亚基 p85 的 mRNA 表达水平。以 PI-3K 亚基 p85 的 cDNA 序列为模版,用 Primer 5.0 软件设计特异引物,其序列为:上游(5'-AC-CCCAGTTTTTGTGCTTG-3'),下游(5'-CCTGC-CCAACATTTAGTCCA-3')。按照说明书采用 Trizol 法提取 RNA,其反应条件是(95 °C,5 min;95 °C,45 s;53 °C,45 s;72 °C,45 s;23 个循环),最后按照 72 °C 延伸 10 min。取适量 RNA 与缓冲液充分混合,点样于事先做好的浓度为 1.5% 琼脂糖凝胶点样孔中,10 V·cm⁻¹电泳 45~60 min,Bio-Rad 全自动凝胶

成像系统成像分析,核酸蛋白测定仪测定灰度值,每组取平均值。

2.4 指标测定 RT-PCR 检测小鼠大脑皮质及海马组织中 PI-3K 蛋白活性及其 mRNA 表达;ELISA 测定小鼠血浆胰岛素水平。

2.5 统计方法 应用 SPSS 17.0 统计软件分析。采用方差分析并进行组间两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 动物行为学影响 给药后,复合给药组和正常组第 5 天潜伏期与第 1 天相比明显缩短,且明显小于罗格列酮组和模型组,其找到平台象限的概率明显大于罗格列酮组和模型组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。说明在改善胰岛素抵抗的基础上,人参皂苷 Rb₁ 可有效改善 2 型糖尿病小鼠的学习和记忆功能。见表 1。

表 1 给药后各组小鼠水迷宫动物行为学变化($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	第 1 天潜伏期/s	第 5 天潜伏期/s	平台象限概率
正常	-	65 ± 29 ²⁾	58 ± 25 ^{1,2)}	1.71 ^{2,3)}
模型	-	86 ± 7	76 ± 21	0.38
罗格列酮	3	86 ± 9	68 ± 33 ¹⁾	0.75
罗格列酮 + 人参皂苷 Rb ₁	3 + 60	66 ± 17 ²⁾	44 ± 35 ^{1,2,3)}	1.02 ^{2,3)}
	3 + 30	70 ± 15 ²⁾	54 ± 30 ^{1,2,3)}	1.19 ^{2,3)}
	3 + 15	74 ± 13 ²⁾	59 ± 21 ^{1,2,3)}	1.33 ^{2,3)}

注:与第 1 天比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$;与罗格列酮组相比³⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 体重和血糖 给药前 Kkay 小鼠体重明显大于正常组 C57BL 小鼠体重($P < 0.05$),正常组小鼠血糖明显低于模型组 Kkay 小鼠血糖($P < 0.05$);给药

后,正常组血糖水平变化不大,模型组血糖水平明显升高并高于其他各组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 给药前后各组小鼠体重及血糖水平以及人参皂苷 Rb₁ 对 Ins R 和 PI-3K/p85 的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	体重/g	血糖/mmol·L ⁻¹	Ins R	PI-3K/p85
给药前正常	-	25.64 ± 1.28	7.55 ± 0.67	-	-
给药前模型	-	37.93 ± 5.03 ¹⁾	20.81 ± 3.37 ¹⁾	-	-
给药后正常	-	28.03 ± 1.32	8.03 ± 1.17	1.55 ± 0.41	0.26 ± 0.12
给药后模型	-	39.18 ± 2.23 ²⁾	24.32 ± 3.89 ²⁾	3.31 ± 0.35 ²⁾	1.07 ± 0.15 ²⁾
罗格列酮	3	39.09 ± 1.76 ²⁾	14.87 ± 3.26 ³⁾	2.892 ± 0.31	0.93 ± 0.10
罗格列酮 + 人参皂苷 Rb ₁	3 + 60	39.77 ± 3.48 ²⁾	15.98 ± 4.95 ³⁾	2.53 ± 0.39 ³⁾	0.53 ± 0.16 ³⁾
	3 + 30	38.72 ± 1.48 ²⁾	13.85 ± 4.15 ³⁾	2.10 ± 0.40 ³⁾	0.40 ± 0.17 ³⁾
	3 + 15	39.38 ± 2.59 ²⁾	14.76 ± 4.03 ³⁾	1.82 ± 0.32 ³⁾	0.28 ± 0.15 ³⁾

注:与给药前正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与给药后正常组比较²⁾ $P < 0.05$;与给药后模型组比较³⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 对血浆 Ins R 的影响 给药后,模型组血浆胰岛素水平明显高于其他各组,差异有统计学意义($P < 0.05$);罗格列酮组血浆胰岛素水平与正常组相比明显升高,且高于联合给药组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

3.4 对脑组织中 PI-3K/p85 表达的影响 模型组

PI-3K/p85 水平明显高于其他各组,差异有统计学意义($P < 0.05$);阳性组 PI-3K/P85 水平明显高于联合给药组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

4 讨论

前期的实验研究中已发现^[6],Kkay 小鼠作为成

熟稳定的胰岛素抵抗型糖尿病模型,其胰岛素受体水平与正常组小鼠无差异,且记忆障碍现象随时间的推移和血糖的升高而逐渐加重;与正常组相比,模型组小鼠 PI-3K/Akt 活性明显降低、糖原合酶激酶-3 β (GSK-3 β)和 Tau 蛋白磷酸化(P-Tau)水平明显增高,这可能是引发 2 型糖尿病小鼠记忆障碍重要原因。在本实验中,给药后,随着阳性组血糖和血浆胰岛素水平的下降,小鼠记忆能力略有所提高,说明单纯缓解胰岛素抵抗可相对改善 2 型糖尿病性记忆障碍,但效果不太显著。联合给药组小鼠给予罗格列酮和人参皂苷 Rb₁ 后,血糖和血浆胰岛素水平较模型组和罗格列酮组明显下降,小鼠记忆能力明显提高;其脑内 PI-3K/p85 水平较模型组和罗格列酮组明显降低,接近正常组水平。这说明人参皂苷 Rb₁ 可有效改善 2 型糖尿病小鼠血浆胰岛素水平和其脑内胰岛素信号传导通路,进而增强小鼠的学习、记忆功能,效果显著。

近年来国内外许多研究表明,2 型糖尿病可诱发记忆功能障碍,其可能的致病机制为胰岛素水平异常导致胰岛素信号传导通路敏感性下降^[7-9]。当胰岛素信号传导通路敏感性下降时会抑制下游途径 PI-3K/Akt 活性,导致 GSK-3 β 活性激增,Tau 蛋白异常磷酸化^[10]。因此,从胰岛素信号传导通路研究和解释糖尿病与记忆障碍的关系及致病机制,对在减缓组织细胞凋亡的同时预防和延缓神经细胞的退行性变、改善记忆功能方面,都具有极为重要的意义。

人参皂苷 Rb₁ 对大脑中枢神经系统有效的保护作用已成为近年来国内外研究的热点。在阿尔茨海默氏病 Tau 蛋白磷酸化大鼠脑片中,人参皂苷 Rb₁ 能增加 PP2A 的表达,从而抑制 Tau 蛋白磷酸化^[11]。而另一些研究表明,在细胞模型中,人参皂苷能抑制 GSK-3 β ,JNK/p38MAPK,p25/CDK5 3 条信号通路的活化,明显减轻凝固态 A β ₍₂₅₋₃₅₎ 诱导的皮层和或海马神经元 Tau 蛋白的过度磷酸化,维持神经元微管结构的稳定性^[3]。同时,人参皂苷能够通过影响中枢酶类和神经递质、保护神经细胞^[12]来有效改善糖尿病性记忆功能障碍,增强学习、记忆能力。

本实验采用已稳定的糖尿病痴呆模型 Kkay 小鼠为研究对象,在不同的生理病理状态下研究小鼠的记忆能力与海马中胰岛素信号传导通路的关系。笔者发现,人参皂苷 Rb₁ 能有效提高 2 型糖尿病性记忆障碍小鼠的学习、记忆能力,减弱大脑海马组织中 PI-3K/p85 表达,提高 PI-3K/Akt 水平,降低 GSK-3 β 活性,纠正 Tau 蛋白的过度磷酸化,改善大脑组

织中胰岛素信号传导通路。这为进一步寻求防治糖尿病性记忆障碍的有效药物提供了理论依据。

[参考文献]

- [1] 张兰兰. 不同来源人参皂苷的比较及人参次苷 H 的研究[D]. 天津:天津大学,2010.
- [2] 樊兴娟,柯开富,姜正林,等. 人参皂苷单体对大鼠局灶性缺血再灌注的神经保护研究[J]. 中华医学杂志,2006,86(29):2071.
- [3] 宋志斌,朱成琳,师方园,等. 人参皂苷 Re 体外抗氧化能力及其对血清剥夺神经细胞作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(7):225.
- [4] Limin Chen, Zhiying Lin, Yuanguai Zhu, et al. Ginsenoside Rb₁ attenuates β -amyloid generation via suppressing PPAR- γ -regulated BACE1 activity in N2a-APP695 cells [J]. Eur J Pharmacol, 2012, 675 (1/3):15.
- [5] 杨秋娅,李晓宇,刘皋林. 人参皂苷 Rb₁ 的药理作用研究进展[J]. 中国药学杂志,2013,48(15):1233.
- [6] 高晓斐,毛黎黎,孙子微,等. 人参皂苷 Rb₁ 与罗格列酮联合给药对 2 型糖尿病记忆障碍小鼠海马胰岛素信号传导通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(8):137.
- [7] Deng Yanqiu, Li Bin, Liu Ying, et al. Dysregulation of insulin signaling, glucose transporters, O-GlcNAcylation, and phosphorylation of tau and neurofilaments in the brain: Implication for Alzheimer's disease[J]. Ame J Pathol, 2009, 175 (5):2089.
- [8] Candeias E, Duarte A, Carvalho C. The impairment of insulin signaling in Alzheimer's disease [J]. IUBMB Life, 2012, 64 (12):951.
- [9] Pedersen W A, Flyrm E R. Insulin resistance contributes to aberrant stress responses in the Tg2576 mouse of Alzheimer's disease [J]. Neuro Biol Dis, 2004,17(3):500.
- [10] Henriksen Erik J, Dokken Betsy B. Role of glycogen synthase kinase-3 in insulin resistance and type 2 diabetes[J]. Current Drug Targets,2006,7(11):1435.
- [11] 李金,刘颖,袁海峰,等. 人参皂苷 Rg₁ 对冈田酸所致大鼠脑片 tau 蛋白磷酸化的影响[J]. 中西医结合学报,2010,8(10):955.
- [12] Xiu-Yun Songa, Jin-Feng Hub, Shi-Feng Chua, et al. Ginsenoside Rg₁ attenuates okadaic acid induced spatial memory impairment by the GSK3 β /tau signaling pathway and the A β formation prevention in rats [J]. Eur J Pharmacol,2013,710(15):29.

[责任编辑 聂淑琴]