

左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠海马 Bcl-2, Bax, Caspase 8 蛋白表达的影响

王宇红^{1*}, 柴上¹, 谭小雯¹, 杨蕙², 孟盼¹, 张秀丽¹

(1. 湖南省中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室培育基地, 长沙 410007

2. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007)

[摘要] **目的:**探讨左归降糖解郁方(ZJJF)对糖尿病并发抑郁症(diabetes mellitus with depression, DD)大鼠海马B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2), Bcl-2相关X蛋白(Bax), 半胱-天冬氨酸蛋白酶8(Caspase 8)蛋白表达的影响。**方法:**采用高脂乳剂灌胃、尾静脉注射链脲佐菌素(STZ, 38 mg·kg⁻¹)与慢性应激联合的方法复制DD模型, 并随机分为3组:模型组, 阳性药(二甲双胍0.18 g·kg⁻¹ + 氟西汀0.0018 g·kg⁻¹)组, ZJJF(32.82 g·kg⁻¹)组, ig给药4周后, 采用旷场实验(OFT)实验, 观察各组大鼠行为学改变; 采用蛋白免疫印迹法(Western blotting)检测模型大鼠海马Bcl-2, Bax, Caspase 8蛋白的表达。**结果:**与正常组比较, 模型组大鼠OFT实验中活动总数明显减少($P < 0.01$); 与模型组比较, 阳性药和ZJJF(32.82 g·kg⁻¹)组大鼠自主活动次数明显增多($P < 0.01$)。与正常组比较, 模型组大鼠海马Bcl-2蛋白表达下降($P < 0.05$), Bax, Caspase8蛋白表达显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较, 阳性药组海马Bcl-2蛋白表达升高($P < 0.05$), Bax, Caspase 8蛋白表达显著降低($P < 0.01$)。与模型组比较, ZJJF(32.82 g·kg⁻¹)组海马Bcl-2表达升高($P < 0.05$), Bax, Caspase 8表达降低($P < 0.05, P < 0.01$)。**结论:**ZJJF可改善糖尿病并发抑郁症大鼠抑郁行为异常, 该作用可能与抑制神经细胞凋亡, 保护海马有关。

[关键词] 糖尿病并发抑郁症; 左归降糖解郁方; B细胞淋巴瘤/白血病-2, Bcl-2相关X蛋白; 半胱-天冬氨酸蛋白酶8

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)03-0106-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015030106

Effects of Zuogui Jiangtang Jieyu Prescription on Expression of Bcl-2, Bax, Caspase 8 in Hippocampus of Diabetes Mellitus Rats with Depression WANG Yu-hong^{1*}, CHAI Shang¹, TAN Xiao-wen¹, YANG Hui², MEN Pan¹, ZHANG Xiu-li¹ (1. Training Bases, Hunan Key Laboratory of Chinese Materia Medica Powder and Innovative Drugs Established by Provincial and Ministry, Changsha 410007, China; 2. First Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Zuogui Jiangtang Jieyu (ZJJF) prescription on expression of Bcl-2, Bax and cysteinecontaining asparatate specific protease (caspase 8) in Hippocampus of diabetes mellitus rats with depression (DD). **Method:** DD model was established by the combination of high-fat diet, injection of streptozotocin (STZ, 38 mg·kg⁻¹), and chronic stress. The model rats were randomly divided into three groups, the DD group, metformin (0.18 g·kg⁻¹) combined fluoxetine (0.0018 g·kg⁻¹) group and ZJJF (32.82 g·kg⁻¹) groups. After 4 weeks of administration, the behavior were observed by the open-field test (OFT) test; Western-blotting was used to detect the expression of B cell lymphoma/leukemia 2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax) and Caspase 8 protein on hippocampal. **Result:** Compared with the normal group, the locomotor activity of model group were significantly reduced ($P < 0.01$). Compared with the model group, the locomotor activity of rats in ZJJF (32.82 g·kg⁻¹) and metformin (0.18 g·kg⁻¹) combined fluoxetine (0.0018 g·kg⁻¹) groups were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the normal group, The Bax and Caspase

[收稿日期] 20141103(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373578,81403379);湖南省自然科学基金项目(13JJ5030);湖南省高校创新平台开放基金项目(13k074)

[通讯作者] *王宇红,博士,研究员,从事中药药理与新药开发, Tel:13787028248; E-mail: 573643177@qq.com

8 expression of hippocampal were significantly increased ($P < 0.01$) and Bcl-2 was reduced ($P < 0.05$) in model group through Western-blotting. Compared with the model group, the average level of hippocampal Bcl-2 was increased ($P < 0.05$) and the Bax and Caspase 8 were significantly reduced ($P < 0.01$) in positive drug group. Compared with the model group, the Bax and Caspase 8 expression were decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$) and Bcl-2 was increased ($P < 0.05$) in ZJJF ($32.82 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$). **Conclusion:** The depressive behavior could be improved by ZJJF, which might be correlated to the inhibition of neuronal apoptosis for protecting the hippocampal.

[**Key words**] diabetes mellitus with depression; Zuogui Jiangtang Jieyu prescription; B cell lymphoma leukemia 2; Bcl-2 associated x protein; caspase 8

糖尿病是由胰岛素分泌缺陷或胰岛素抵抗引起的内分泌代谢障碍性疾病,以慢性高血糖为主要特征。社会压力的增大会加速糖尿病的恶化,并诱发抑郁的产生,逐渐形成糖尿病并发抑郁症(diabetes mellitus with depression, DD)。研究表明,60% ~ 75%的糖尿病患者伴有抑郁情绪,当中的10% ~ 35%为重度抑郁^[1]。且糖尿病与抑郁症相互作用,相互影响,大大增加了糖尿病患者的病死率和致残率^[2-3]。目前,西医治疗 DD 存在易复发,副作用大等缺点^[4]。近年来海马已逐渐成为了 DD 发生发展的关键靶器官^[5-8],而凋亡是海马细胞损伤的主要方式。因此,减少海马区神经细胞凋亡可能将成为治疗 DD 的一个重要途径。原癌基因蛋白 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2)家族通过影响线粒体膜的通透性,在细胞凋亡信号转导途径中发挥重要作用。同时激活凋亡执行者半胱-天冬氨酸蛋白酶(cysteinecontaining aspartate specific protease, Caspase)促使凋亡的最终完成。前期研究证实,左归降糖解郁方(ZJJF)可以保护海马病理性损伤^[5]。在此基础上,本实验检测 ZJJF 对海马 Bcl-2, Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax),Caspase 8 蛋白的表达的影响,以探讨其抑制海马神经元凋亡,治疗 DD 的机制。

1 材料

1.1 试剂 链脲佐菌素(美国 Sigma 公司,批号 126A038),高脂乳剂[组成:10%胆固醇(厦门英伟生物技术有限公司,批号 20140107),0.2%丙硫氧嘧啶(Lomapharm Rudolf Lohmann GmbH KG Germany 公司,批号 004020),20%猪油,2%胆酸钠(Solarbio 公司,批号 20140110),20%聚山梨酯-80(天津市科密欧化学试剂有限公司,批号 20130927),20%丙二醇(湖南汇虹试剂有限公司,批号 20130927),加蒸馏水至 100 mL]。Western blotting 免疫印迹法细胞凋亡蛋白抗体 Bcl-2(Santa Cruz 公司,批号 A1502), Bax(Santa Cruz 公司,批号 F5087p),Caspase 8

(Abcam 公司,批号 GR102554-1),BCA 蛋白定量试剂盒(Thermo 公司,批号 0G191848),RIPA 组织细胞快速裂解液(上海基尔顿生物公司,批号 20140317)。

1.2 药物 ZJJF 的组成药物为黄芪 18 g,贯叶连翘 3 g,姜黄 9 g,熟地黄 15 g,山茱萸 12 g,枸杞子 12 g,菟丝子 9 g,杜仲 9 g,丹参 12 g,丹皮 6 g,牛膝 9 g。饮片购自湖南中医药大学第一附属医院,并由该院制剂科按比例水煎浓缩后制成口服液 100 mL,建立了一测多评的质量控制方法,其含主要药效成分分别为黄芪甲苷 $\geq 0.03 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,贯叶金丝桃素 $\geq 0.018 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,姜黄素 $\geq 0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,丹酚酸 B $\geq 1.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,丹皮酚 $\geq 0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。盐酸二甲双胍片(批号 1303106,湖南湘雅制药有限公司);氟西汀(盐酸氟西汀胶囊,批号 0972A,法国 Patheon)。

1.3 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只,180 ~ 200 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,合格证号 SCXK(湘)2013-0004。全价颗粒饲料由湖南中医药大学 SPF 级实验动物中心提供。

1.4 仪器 One Touch II 型血糖仪及血糖试纸(美国强生公司),HI1210 型水浴锅(Leica 公司),Mini protean 3 cell 型电泳仪(Bio Rad 公司),PS-9 型电转仪(大连竞迈科技有限公司),MK3 型酶标仪(芬兰雷勃公司)。

2 方法

2.1 糖尿病并发抑郁症动物模型的建立 SD 大鼠以高脂乳剂 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 连续 14 d,每天 1 次。末次 ig 高脂乳剂后,大鼠禁食不禁水 24 h,1 次性尾静脉注射链脲佐菌素(STZ,溶于新鲜配制的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,pH 4.5 枸橼酸缓冲液中, 4°C 保存) $38 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,I 组大鼠 1 次性尾静脉注射 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,pH 4.5 枸橼酸缓冲液,注射体积为 $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。造模 72 h 后,大鼠禁食不禁水 7 h,测定空腹血糖,从中选取空腹血糖 $\geq 16.00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的大鼠为糖尿病模

型。继续给予糖尿病模型动物 28 d 慢性应激^[5], 具体包括 4 ℃ 冰水浴 5 min, 45 ℃ 热刺激 5 min, 倾笼 45 度 24 h, 噪音 8 h, 昼夜颠倒 24 h, 潮湿垫料, 夹尾 1 min。每天采用 1 种刺激, 同种刺激不连续出现。

2.2 分组与给药 糖尿病并发抑郁症大鼠随机分为 3 组, 糖尿病并发抑郁症组(模型组), 二甲双胍 0.18 g·kg⁻¹ + 氟西汀组 0.001 8 g·kg⁻¹ (阳性药组), ZJJF(32.82 g·kg⁻¹) 组。另取 10 只 SD 大鼠作为正常对照组。各组大鼠灌胃给药 28 d(给药与慢性应激同期进行), 正常对照组和模型组给予等体积生理盐水。给药后取大鼠大脑组织进行指标检测。

2.3 指标测定

2.3.1 行为学开野试验 采用长×宽×高=80 cm×80 cm×40 cm 的敞箱, 底面划分成 25 个面积相等的方格, 大鼠适应 1 min 后, 观察并拍摄大鼠 3 min 内水平运动格数(四爪皆进入记为 1 分)、垂直竖立次数(两前爪腾空或攀附箱壁记为 1 分), 以总分为最后得分。每次均从同一角落放入, 测评结束后, 用消毒液擦拭, 晾干待用。每周进行 1 次评估。

2.3.2 检测 Bcl-2, Bax, Caspase8 蛋白表达 将组织剪成细小的碎片, 按每 20 mg 组织加入 0.15 ~ 0.25 mL 裂解液的比例加入, 裂解液(裂解液中加入蛋白酶和磷酸酶抑制剂), 裂解后的样品 4 ℃ 12 000 ×g 离心 15 min, 取上清, 进行蛋白质定量后贮存于 -80 ℃ 冰箱。用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定其蛋白含量。根据目的蛋白的相对分子质量选择不同的凝胶浓度。浓缩胶 80 V 20 min, 分离胶 120 V 60 min, 电泳至溴酚蓝抵达凝胶底时, 关闭电源。利用电磁场的作用, 将聚丙烯酰胺凝胶中的蛋白分子转移至 NC 膜上。用去离子水冲洗 NC 膜, 再用丽春红预染后, 将目的条带和内参条带裁剪下标记后用 TBST 洗去丽春红。将目的膜条和内参膜条分别置于原位杂交袋中, 加入相应的一抗, 4 ℃ 过夜。使用 TBST 稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗封闭缓冲液(1:1 000), 室温孵育 1 h。使用 TBST

稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗封闭缓冲液(1:1 000), 室温孵育 1 h。洗膜, 用 ECL 化学发光检测。通过 Image 2X 软件扫描图片得出灰度值, 反应蛋白表达的强度。

2.4 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析, 所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间的比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析(One-Way-ANOVA), *t* 检验, 双侧检验。*P* < 0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 OFT 法测定各组大鼠自主活动情况 与正常组比较, 模型组大鼠 OFT 实验中活动总数明显减少(*P* < 0.01); 与模型组比较, 阳性药二甲双胍 + 氟西汀组和 ZJJF 组大鼠自主活动次数明显增多(*P* < 0.01)。见表 1。

表 1 左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠自主活动的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of ZJJF on locomotor activity of DM rats with depression ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	自主活动数/次
正常	-	47 ± 11 ²⁾
模型	-	4 ± 2
二甲双胍 + 氟西汀	0.18 + 0.001 8	44 ± 9 ²⁾
ZJJF	32.82	23 ± 7 ²⁾

注: 与模型组比较 ¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01 (表 2 同)。

3.2 对海马组织中细胞凋亡相关蛋白 Bax, Bcl-2 和 Caspase-8 的影响 与正常组比较, 模型组海马 Bcl-2 蛋白表达下降(*P* < 0.05), Bax, Caspase 8 蛋白表达显著升高(*P* < 0.01)。与模型组比较, 阳性药(二甲双胍 + 氟西汀)组海马 Bcl-2 蛋白表达升高(*P* < 0.05), Bax, Caspase 8 蛋白表达显著降低(*P* < 0.01)。与模型组比较, ZJJF 组海马 Bcl-2 表达升高(*P* < 0.05), Bax, Caspase 8 表达降低(*P* < 0.05, *P* < 0.01)。见表 2。

表 2 左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠海马 BAX, Bcl-2 和 Caspase 8 蛋白表达灰度值的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of ZJJF on gray value of Bcl-2, Bax, Caspase 8 in hippocampus of DM rats with depression ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	蛋白表达/灰度		
		BAX	Bcl-2	Caspase 8
正常	-	724 ± 206 ²⁾	4 550 ± 1 183 ¹⁾	1 265 ± 393 ²⁾
模型	-	45 326 ± 5 736	1 826 ± 500	3 131 ± 510
二甲双胍 + 氟西汀	0.18 + 0.001 8	11 876 ± 747 ²⁾	4 603 ± 1 192 ¹⁾	1 128 ± 469 ²⁾
ZJJF	32.82	2 259 ± 1 293 ¹⁾	4 544 ± 1 364 ¹⁾	1 417 ± 309 ²⁾

4 讨论

本课题组采用高脂灌胃,STZ注射和慢性应激相结合的方式,首次成功复制糖尿病并发抑郁症动物模型。OFT是目前国内外公认的,一种用于反映抑郁动物行为及情绪反应的实验方法。其总分较好地体现了动物的自发活动能力和探索能力。本实验发现DD模型大鼠自主活动次数较正常组明显减少,说明动物表现出抑郁状态和兴趣丧失。而经ZJJF治疗后,大鼠自主活动次数明显升高。表明ZJJF能有效干预DD大鼠抑郁状态的出现。

海马是中枢神经系统内参与学习记忆的重要结构。而抑郁症行为学异常与海马损伤密切相关^[9-10]。前期研究发现DD大鼠海马锥体细胞可见不同程度的胞体深染及空泡变性,但具体分子机制尚不清楚^[5]。近年研究提示,Bcl-2家族可通过参与神经元凋亡来介导海马损伤。该家族主要包括凋亡抑制蛋白Bcl-2和凋亡促进蛋白Bax等。它们通过调节线粒体膜的通透性来影响细胞的状态。在此基础上,Bax,Bcl-2可激活caspase来引发凋亡的最终发生。其中Caspase 8是凋亡死亡受体通路中的重要分子^[11-14]。本实验研究发现DD模型大鼠海马Bcl-2蛋白表达下降,Bax,Caspase 8蛋白表达明显上升;经ZJJF干预后可升高模型大鼠Bcl-2蛋白,降低Bax,Caspase 8蛋白表达。说明DD模型大鼠能通过减少Bcl-2蛋白,增加Bax,Caspase 8蛋白表达而促进海马细胞凋亡,损伤海马。而ZJJF则可通过提高Bcl-2蛋白,拮抗Bax,Caspase 8蛋白表达而抑制海马细胞凋亡。

总之,笔者以张景岳左归饮、左归丸为基础方,经化裁而得基本方“左归降糖方”(方中熟地黄为君滋养肾阴,山茱萸、枸杞子为臣,合君药以加强滋补肾阴作用,佐以菟丝子、牛膝、杜仲补肝、肾,黄芪健脾益气,丹参、丹皮活血散瘀),又加入化瘀行气、疏肝解郁的姜黄和贯叶连翘组成“左归降糖解郁方”^[15],进一步探讨该方对糖尿病并发抑郁症的干预作用。实验结果证实了DD状态下的海马损害与凋亡调控因子Bcl-2,Bax和Caspase 8表达的变化相关。而ZJJF则能通过影响调控因子Bcl-2,Bax和Caspase 8蛋白的表达而对DD状态下的海马损伤具有保护作用,进而改善其抑郁症状。

[参考文献]

- [1] Egede L E, Ellis C. Diabetes and depression: global perspectives[J]. *Diabetes Res Clin Pract*,2010,87(3): 302-312.
- [2] Tiziana L, Ernestina C, Shilpa N, et al. Diabetes and depression comorbidity and socio-economic status in low and middle income countries (LMICs): a mapping of the evidence[J]. *Global Health*, 2012, 8:39.
- [3] François Pouwer. Should we screen for emotional distress in type 2 diabetes mellitus [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2009, 5(12):665- 671.
- [4] 宣磊. 糖尿病合并抑郁症的中西医治疗 [J]. *中国临床医生*,2011,39(11):15,17.
- [5] 杨蕙. 糖尿病并发抑郁症动物模型的建立及中药干预作用[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2013.
- [6] Prestele S, Aldenhoff J,Reiff J, et al. The HPA-axis as a possible link between depression, diabetes mellitus and cognitive dysfunction [J]. *Fortsehr Neurol Psychiatr*, 2003, 71(1):24-36.
- [7] Heim C, Nemeroff C B. Neurobiology of posttraumatic stress disorder[J]. *CNS Spectr*, 2009 ;14(Suppl 1): 13-24.
- [8] 温艳艳, 邓晓明. 2型糖尿病合并抑郁症的研究进展 [J]. *中国实用医刊*, 2011, 38(5):84-86.
- [9] McEwen B S. Stress and hippocampal plasticity [J]. *Annu Rev Neurosci*,1999,22(Suppl 1):105-22.
- [10] 王雪琦,王勇姿,何成,等. 睫状神经营养因子对抑郁大鼠行为和海马神经元损伤的影响[J]. *中华精神科杂志*,2003,36(1):41-44.
- [11] Rosse T, Olivier R, Monney L, et al. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c [J]. *Nature*,1998, 391(6666):496-499.
- [12] Hui H,Dotta F,Di Mario U, et al. Role of caspases in the regulation of apoptotic pancreatic islet beta-cells death[J]. *J Cell Physiol*,2004,200(2):177-200.
- [13] Li H,Zhu H, Xu C, et al. Cleavage of Bid by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis [J]. *Cell*,1998;94(4):491-501.
- [14] Hengartnermo. The biochemistry of apoptosis [J]. *Nature*,2000,407(6805):770-776.
- [15] 王宇红,杨蕙,尹玲桃,等. 左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠血糖血脂的影响[J]. *中草药*,2014, 45(11):1602-1606.

[责任编辑 聂淑琴]