

金芪降糖片对糖尿病引发的认知功能障碍的影响及机制

杨丽¹, 徐利满¹, 朱晓丹², 刘红玥¹, 靳学海², 宋丽丽¹,
Alemu Paulos N¹, 庄朋伟^{1*}, 张艳军^{1*}

(1. 天津中医药大学 天津市中药药理重点实验室, 天津 300193;
2. 天津中新药业集团股份有限公司隆顺裕制药厂, 天津 300457)

[摘要] 目的:探讨金芪降糖片对糖尿病引发的认知功能障碍的影响,并初步探讨其作用机制。方法:选用 C57BL/6J 小鼠,采用 ip 链脲佐菌素(STZ, 120 mg·kg⁻¹)复合高脂饮食的方法诱导复制 2 型糖尿病模型。利用 Morris 水迷宫试验筛选出存在糖尿病认知功能障碍的小鼠,并随机将其分为 4 组,每组 14 只,分别为模型组,阳性药组(盐酸二甲双胍 0.45 g·kg⁻¹),金芪降糖片高(2 倍临床等效剂量 1.31 g·kg⁻¹)及低(临床等效剂量 0.655 g·kg⁻¹)剂量组。正常组和模型组均给予等量蒸馏水,连续 ig 给药 10 周。在给药前及给药 10 周后,各测一次小鼠的空腹血糖(FBG)和体重。10 周后, Morris 水迷宫实验检测小鼠学习记忆能力;尼式染色观察海马 CA1 区形态学变化;酶联免疫吸附测定(ELISA)检测小鼠血清脑源性神经营养因子(BDNF)水平;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)法检测小鼠海马组织突触素(SYN) mRNA 表达水平。结果:与正常组比较,模型组糖尿病小鼠 FBG 明显升高,记忆能力下降,海马神经损伤明显,血清 BDNF 水平明显降低,海马 SYN mRNA 表达水平明显降低,体重明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,金芪降糖片高剂量组可降低糖尿病小鼠 FBG,改善学习记忆能力,改善海马神经损伤状况,显著升高血清 BDNF 水平,显著增加海马 SYN mRNA 表达水平,各治疗组小鼠体重较稳定,差异均具有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论:金芪降糖片可以改善糖尿病小鼠的学习记忆能力,可能是通过上调 BDNF 含量对海马神经细胞保护及营养修复,并促进海马 SYN mRNA 表达上调调节海马神经突触可塑性实现的。

[关键词] 糖尿病; 认知障碍; 金芪降糖片; 突触素; 脑源性神经营养因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)01-0146-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017010146

Effect and Mechanisms of Jinqi Jiangtang Tablet on Cognitive Dysfunction Induced by Diabetes

YANG Li¹, XU Li-man¹, ZHU Xiao-dan², LIU Hong-yue¹, JIN Xue-hai², SONG Li-li¹,
Alemu Paulos N¹, ZHUANG Peng-wei^{1*}, ZHANG Yan-jun^{1*}

(1. Tianjin Key Laboratory of Pharmacology of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; 2. Tianjin Zhongxin Pharmaceutical Group Co. Ltd., Longshuirong Pharmaceutical Factory, Tianjin 300457, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects and initial mechanisms of Jinqi Jiangtang tablet on the cognitive dysfunction induced by diabetes. **Method:** C57BL/6J mice received STZ (120 mg·kg⁻¹) by single intraperitoneal injection combined with high fat food to induce type 2 diabetic mice models. After 8 weeks, Morris water maze test was carried out to select the mice with cognitive dysfunction, then the selected ones were randomly divided into model group, metformin hydrochloride positive drug group, high dose (twice the clinical equivalent

[收稿日期] 20151216(020)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81403213);“十二五”期间天津市高等学校“创新团队培养计划”项目(TD12-5035)

[第一作者] 杨丽,在读硕士,从事中药药理研究, Tel:022-59596138, E-mail:yljiayou77@163.com

[通讯作者] *张艳军,教授,从事中药药理研究工作, Tel: 022-59596138, E-mail:zyjsunye@163.com;

*庄朋伟,副教授,从事中药药理研究工作, Tel:022-59596138, E-mail:zhuangpengwei@163.com

dose, $1.31 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and low dose (clinical equivalent dose, $0.655 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) Jinqi Jiangtang tablet groups, $n = 14$ in each group. The mice in normal group and model group received the same volume of distilled water for 10 weeks. Fasting blood glucose (FBG) and body weight of the mice were measured once respectively before and after administration for 10 weeks. After treatment for 10 weeks, the learning and memory ability was tested by Morris water maze; morphological changes of the hippocampus CA1 area were observed by Nissl staining; the levels of brain derived neurotrophic factor (BDNF) in serum were detected by ELISA; synaptophysin (SYN) mRNA expression level in hippocampus was tested by Real-time PCR. **Result:** As compared with the normal group, FBG level was significantly increased in mice of model group; memory ability was reduced; with obvious hippocampal nerve injury, and serum BDNF levels were significantly decreased; SYN mRNA expression level in hippocampus was significantly reduced, and the body weight was also reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$). As compared with the model group, Jinqi Jiangtang tablet high dose group could decrease the level of fasting blood-glucose of the diabetic mice, improve the learning and memory ability and hippocampal nerve injury, significantly increase the level of the serum BDNF and SYN mRNA expression in hippocampus; the body weight in mice of various treatment groups was stable, with statistical difference ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Jinqi Jiangtang tablet may improve the learning and memory ability in diabetic mice by up-regulating the level of BDNF to protect and nourish the hippocampal neurons and up-regulating SYN mRNA expression in hippocampus to improve the cognitive deficits of the cognitive dysfunction mice.

[**Key words**] diabetes; cognitive dysfunction; Jinqi Jiangtang tablet; synaptophysin; brain derived neurotrophic factor

糖尿病已经成为世界流行的代谢疾病,可以引发多种并发症,是致死、致残的主要原因^[1]。其中,糖尿病引发的认知功能障碍是糖尿病患者中具有高发病率的严重并发症,主要表现为认知功能减退、学习记忆能力减弱等。是多种因素共同作用的病理过程,发病机制较复杂,严重影响糖尿病患者的生活质量。中枢神经系统功能受损是导致认知功能障碍的重要原因。目前,国内外对糖尿病损害中枢神经的研究并不多,虽然已经报道二甲双胍、格列苯脲等一些传统治疗降血糖药物有一定控制糖尿病认知损伤的作用,但目前为止并没有治疗糖尿病认知障碍的有效药物上市^[2-4]。因此,研究糖尿病所致认知障碍的发病机制,寻找有效的防治药物具有重要意义。

从中医角度来看,糖尿病属于“消渴、呆症”范畴,基本病机为阴津亏损、燥热偏胜;气虚血瘀、瘀血内阻、蒙蔽脑窍。治疗应清热润燥、养阴生津;补肾填精、营养脑髓^[5-6]。中药复方金芪降糖片是由金银花、生黄芪、黄连组成的中成药,是目前中医临床治疗消渴症的常用药^[7-8]。据报道,金芪降糖片能有效的治疗 2 型糖尿病,具有多组分多靶点的抗糖尿病作用,其机制包括清除自由基、抑制 α -糖苷酶、抑制脂肪酶、抑制一氧化氮(NO)释放、抑制醛糖还原酶等^[5]。金芪降糖片主要包含小檗碱、黄芪甲苷及绿原酸 3 种有效活性成分^[9]。大量研究报道,小

檗碱、黄芪甲苷及绿原酸均具有有效的神经保护作用,可有效改善脑损伤动物模型的认知缺陷^[10-14]。但金芪降糖片对糖尿病小鼠是否有神经保护作用,是否能够改善糖尿病引发的认知功能障碍,尚无实验依据。因此,本实验通过观察金芪降糖片对糖尿病认知障碍小鼠行为学的影响,海马组织病理变化,血清脑源性神经营养因子(BDNF)水平变化及海马组织突触素(SYN) mRNA 的表达变化,初步探讨其对糖尿病认知障碍小鼠学习记忆能力的影响及可能的作用机制。

1 材料

1.1 动物 健康雄性 C57BL/6J 小鼠,12 周龄,体重 $18 \sim 20 \text{ g}$,SPF 级,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,动物合格证号 SCXK(京)2009-0017。

1.2 药物及试剂 金芪降糖片(天津中新药业集团股份有限公司隆顺榕制药厂,批号 CE87041),盐酸二甲双胍片(天津太平洋制药有限公司,批号 3314191),链脲佐菌素(streptozotocin, STZ,美国 Sigma 公司,批号 WXBC1125V),D12492 高脂饲料(购于北京华阜康生物科技股份有限公司),脑源性神经营养因子(BDNF)ELISA 试剂盒(上海宝曼生物技术公司,批号 2015011924b),甲酚紫(美国 Sigma,批号 MKBN4887V);RNAsimple Total RNA 试剂盒(离心柱型),FastQUANT RT 试剂盒(with gDNase),

SuperReal PreMix Plus(SYBR Green)(北京天根生化科技有限公司,批号分别为 03324,04102,03717);稳毫便携式血糖仪及试纸(美国强生公司,批号 3813427)。

1.3 仪器 Morris 水迷宫自动监控仪(淮北正华生物仪器设备有限公司),7500 Fast 型实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)仪(新加坡 Applied Biosystems 公司),3K 15 型离心机(德国 Sigma 公司),Infinite M200 Pro 型多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司),CM1850 型冰冻切片机及 DM4000B 型荧光显微镜(德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 糖尿病小鼠模型的建立^[10] 随机将 100 只小鼠分为正常组($n=14$)和模型组($n=86$),正常组予以普通饲料,模型组予以高脂饲料。喂养 3 周后开始造模,造模前禁食 12 h,模型组按 $120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 一次性 ip STZ。1 周后小鼠尾静脉取血测空腹血糖(FBG)值 $>11.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 者成为糖尿病模型小鼠。正常组在相同条件下仅注射等体积柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 4.5)。

2.2 糖尿病认知功能障碍小鼠的筛选 各组小鼠在 $18 \sim 25 \text{ }^\circ\text{C}$ 室温下常规饲养,模型组小鼠予以高脂饲料,正常组小鼠予以正常饲料。根据文献报道,糖尿病小鼠在成模第 8 周时即出现明显的认知障碍症状。饲养 8 周后,进行 Morris 水迷宫测试。水迷宫定位航行实验中,随着训练时间的延长,实验动物会逐渐学习并记住逃生平台所在位置,平均逃避潜伏时间可以反映实验小鼠的学习记忆能力,随着训练次数的增加,小鼠平均逃避潜伏时间会逐渐缩短。当正常组与糖尿病模型组小鼠的逃避潜伏期出现明显差异时,筛选出模型组里与正常组比较逃避潜伏期较长且无规律性的小鼠即具有糖尿病认知功能障碍的小鼠。

2.3 分组及给药 糖尿病认知功能障碍小鼠随机分为 4 组,分别为糖尿病认知功能障碍组(模型组),二甲双胍阳性组(盐酸二甲双胍 $0.45 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),金芪降糖片高(2 倍临床等效剂量 $1.31 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)及低(临床等效剂量 $0.655 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)剂量组,每组 14 只。模型组及正常组给予等量蒸馏水,每日 1 次,连续 ig 给药 10 周。在给药前及给药 10 周后,各测 1 次小鼠的空腹血糖(FBG)和体重。

2.4 空间学习记忆能力测试 各组小鼠在 10 周末进行水迷宫测试,检验小鼠学习记忆能力。于实验开始前 1 d 将所有小鼠在无平台的圆形水池(直径

1.2 m)中自由游泳 1 min,适应熟悉迷宫环境。实验开始时,将圆形水池等分为 4 个象限 N,E,S,W,每个象限池壁上标有不同标志所示的入水点。将实验平台(直径 9 cm)置于第 2 象限,隐蔽于水下 1 cm。随机选取一个入水点,将小鼠面向池壁放入水中,记录小鼠从入水至找到平台的时间。如果在 60 s 内未找到隐藏平台,潜伏期记为 60 s,并将小鼠引导至平台停留 10 s 后取出。实验共进行 5 次,观察记录各组小鼠的逃避潜伏期。数据采集由图像自动监视和处理系统完成。

2.5 各组小鼠海马组织病理学检查 实验结束后,小鼠分别用 50 mL 生理盐水与 50 mL 4% 多聚甲醛进行脑灌注后取脑组织,4% 多聚甲醛固定过夜,20% 及 30% 蔗糖溶液依次脱水,冰冻切片机切片,片厚 $10 \text{ } \mu\text{m}$,尼式染色。染色步骤:三氯甲烷浸泡 1 min;无水乙醇浸泡 1 min;95% 乙醇浸泡 1 min;70% 乙醇浸泡 1 min;流水冲洗 5 min;0.1% 甲酚紫溶液水浴 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 染色 30 min;95% 乙醇分色 30 s;脱水,透明,中性树脂封印。显微镜下观察各组实验小鼠海马 CA1 区神经细胞的形态以及数量的变化情况。

2.6 各组小鼠血清中 BDNF 的含量测定 小鼠目内眦取血, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上层血清,按照酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒说明书进行实验检测各组小鼠血清中 BDNF 的含量。

2.7 各组小鼠海马 SYN mRNA 水平的检测 取海马组织放进预先用液氮预冷的研钵中,加裂解液 RZ(组织 $50 \sim 100 \text{ mg}$ 加 1 mL 裂解液),充分研磨裂解后转移至无 RNase 的离心管中,室温下放置 5 min。 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,取上清,转入一个新的无 RNase 的离心管中。然后按 RNAsimple Total RNA 试剂盒(离心柱型)说明书提取各组小鼠海马总 RNA,测定其纯度及含量。取总 RNA 500 ng,按照逆转录试剂盒说明书逆转录成 cDNA。取 cDNA $1 \text{ } \mu\text{L}$ 采用两步法进行 PCR 扩增反应,反应体系 $20 \text{ } \mu\text{L}$ 。小鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)上游引物 5'-CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG-3',下游引物 5'-GGCCATCCACAGTCTTCTG-3',扩增片段为 91 bp;小鼠 SYN 上游引物 5'-GGAGTGGGTC GATGTGACTT-3',下游引物 5'-TTGGCTGACTGG TCCTCTCT-3',扩增片段为 203 bp。以 GAPDH 基因作为内参基因。小鼠 SYN 引物、内参 GAPDH 引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司提供。扩增反应条件为 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 15 min, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 10 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火/延伸 30 s,用 Real-time PCR 仪扩增,共 40 个

循环。最后用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示 mRNA 的相对表达量。

2.8 统计学分析 实验数据通过统计软件 SPSS 17.0 进行统计分析,数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, Morris 水迷宫测试数据采用多次重复测量方差分析方法分析,其余数据均采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对糖尿病认知障碍小鼠 FBG 及体重的影响

表 1 金芪降糖片对糖尿病认知障碍小鼠 FBG 及体重的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 14$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	FBG/ $mmol \cdot L^{-1}$		体重/g	
		给药前	给药后	给药前	给药后
正常	-	$4.9 \pm 1.02^{2)}$	$3.4 \pm 0.4^{2)}$	24.80 ± 2.00	$26.93 \pm 1.90^{2)}$
模型	-	19.7 ± 2.8	16.0 ± 4.4	25.55 ± 1.75	23.80 ± 2.27
二甲双胍	0.45	19.1 ± 5.9	$8.9 \pm 5.1^{2)}$	26.41 ± 1.60	$26.50 \pm 2.07^{2)}$
金芪降糖片	1.31	19.3 ± 6.5	$10.8 \pm 3.3^{1)}$	27.51 ± 2.07	$25.57 \pm 2.03^{2)}$
	0.655	18.4 ± 2.4	13.1 ± 5.8	26.10 ± 1.72	$25.14 \pm 2.71^{1)}$

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

3.2 对糖尿病认知障碍小鼠空间学习记忆能力的影响 水迷宫定位航行试验第 1 次模型组小鼠与给药干预组小鼠的逃避潜伏期未见有明显差异。从第 3 次起,与正常组比较,模型组小鼠的逃避潜伏期明

显延长 ($P < 0.05$);与模型组比较,给药干预组小鼠的逃避潜伏期则均有不同程度的缩短 ($P < 0.05$)。结果提示金芪降糖片具有一定改善认识障碍小鼠学习记忆能力的作用。见表 2。

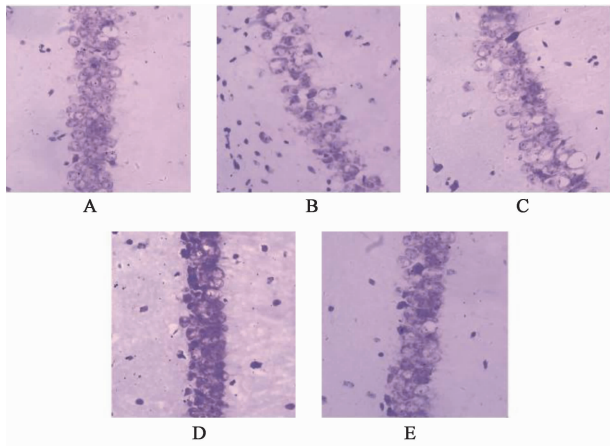
表 2 金芪降糖片对糖尿病认知障碍小鼠空间学习记忆能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 14$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	逃避潜伏期/s				
		第 1 次	第 2 次	第 3 次	第 4 次	第 5 次
正常	-	24.6 ± 15.5	21.2 ± 13.2	$12.9 \pm 8.1^{1)}$	$8.2 \pm 3.0^{1)}$	$10.1 \pm 4.8^{1)}$
模型	-	46.3 ± 18.6	35.4 ± 23.6	30.4 ± 13.7	22.1 ± 10.9	24.3 ± 9.9
二甲双胍	0.45	44.1 ± 15.2	35.7 ± 18.2	$16.2 \pm 7.4^{1)}$	$12.0 \pm 3.4^{1)}$	$10.5 \pm 5.8^{1)}$
金芪降糖片	1.31	38.2 ± 16.7	26.3 ± 15.8	$15.6 \pm 5.1^{1)}$	$13.7 \pm 4.2^{1)}$	$11.7 \pm 5.2^{1)}$
	0.655	36.3 ± 16.7	30.2 ± 12.3	$15.4 \pm 8.9^{1)}$	$10.2 \pm 4.4^{1)}$	$14.7 \pm 6.3^{1)}$

3.3 对糖尿病认知障碍小鼠海马 CA1 区神经细胞的影响 尼式染色结果显示,正常组小鼠 CA1 区存在大量神经细胞,细胞排列整齐紧密,结构完整,胞体圆而大。模型组小鼠 CA1 区海马神经细胞缺失,密度显著降低,神经细胞受损,排列紊乱,胞体变小皱缩,细胞核固缩、浓染。二甲双胍对照组及金芪降糖片高剂量组与模型组比较,神经细胞数量均较多,细胞形态较完整,核固缩浓染数量较模型组显著减少。金芪降糖片低剂量组小鼠 CA1 区海马神经细胞有损伤,细胞核固缩,但神经细胞较多,排列较整齐,较模型组好。见图 1。

3.4 对糖尿病认知障碍小鼠血清 BDNF 的影响 与正常组比较,模型组小鼠血清 BDNF 含量显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,二甲双胍阳性药组、金芪降糖片高剂量组小鼠血清 BDNF 含量明显升高 ($P < 0.05$)。金芪降糖片低剂量组未表现出显著性作用。见表 3。

3.5 对糖尿病认知障碍小鼠海马组织 SYN mRNA 表达的影响 模型组小鼠海马组织 SYN mRNA 表达显著降低 ($P < 0.01$),二甲双胍组及金芪降糖片高剂量组 SYN mRNA 表达显著升高;与模型组比较有显著性差异 ($P < 0.01$),金芪降糖片低剂量组与



A. 正常组; B. 模型组; C. 二甲双胍 0.45 g·kg⁻¹组; D. 金芪降糖片 1.31 g·kg⁻¹组; E. 金芪降糖片 0.655 g·kg⁻¹组

图 1 金芪降糖片对糖尿病认知障碍小鼠海马 CA1 区神经细胞的影响(尼式染色, ×400)

Fig.1 Effect of Jinqi Jiangtang tablet on neurons of hippocampus CA1 zone of diabetic cognitive dysfunction mice(Nissl, ×400)

表 3 金芪降糖片对糖尿病认知障碍小鼠血清 BDNF 的影响($\bar{x} \pm s$, n = 14)

Table 3 Effect of Jinqi Jiangtang tablet on serum BDNF of diabetic cognitive dysfunction mice($\bar{x} \pm s$, n = 14)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	BDNF/ng·L ⁻¹
正常	-	404.15 ± 56.28 ²⁾
模型	-	277.12 ± 95.26
二甲双胍	0.45	370.95 ± 30.82 ¹⁾
金芪降糖片	1.31	348.23 ± 92.68 ¹⁾
	0.655	297.32 ± 85.71

模型组比较有增加 SYN mRNA 表达的趋势,但没有统计学意义。见表 4。

表 4 金芪降糖片对糖尿病脑病小鼠海马组织 SYN mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$, n = 3)

Table 4 Effect of Jinqi Jiangtang tablet on SYN mRNA expression in hippocampus of diabetic cognitive dysfunction mice($\bar{x} \pm s$, n = 3)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	SYN
正常	-	0.24 ± 0.03 ²⁾
模型	-	0.05 ± 0.01
二甲双胍	0.45	0.20 ± 0.05 ²⁾
金芪降糖片	1.31	0.18 ± 0.02 ²⁾
	0.655	0.11 ± 0.01

4 讨论

本实验采用 STZ 联合高脂饲料复制 2 型糖尿病认知障碍小鼠模型,金芪降糖片治疗的方法,探究金芪降糖片对糖尿病小鼠认知功能的影响。本实验结果表明,二甲双胍及金芪降糖片在一定程度上均可

以改善糖尿病小鼠的学习记忆能力。模型组小鼠 CA1 区海马神经细胞的数量显著降低,神经细胞受损,排列紊乱,胞体变小皱缩,细胞核固缩、浓染。金芪降糖片干预组小鼠海马 CA1 段神经细胞数量较模型组多,细胞形态较完整,核固缩浓染数量有所减少,而且金芪高剂量海马神经细胞损伤程度比低剂量组轻,说明金芪降糖片对糖尿病小鼠具有脑神经保护作用。同时也说明糖尿病小鼠海马 CA1 段的神经细胞变性及其缺失对其认知功能障碍的发生起重要作用。ELISA 检测结果显示模型组小鼠血清中脑源性神经营养因子 BDNF 的含量明显降低,而金芪高剂量组、二甲双胍阳性药组小鼠血清 BDNF 则显著升高;PCR 检测模型组小鼠海马组织 SYN mRNA 表达显著降低,二甲双胍组及金芪高剂量组则显著性升高。这说明金芪降糖片可能是通过上调脑内 BDNF 含量来发挥神经保护及营养修复作用,并促进海马区 SYN mRNA 表达上调来调节海马神经突触可塑性,改善糖尿病小鼠认知功能障碍的。

BDNF 是神经营养因子家族的一员,作为一种内源性神经营养因子,具有防止神经元受损伤死亡,改善神经元病理状态,调节神经可塑性等重要的作用,负责中枢神经系统神经细胞的增殖及营养修复^[15]。有研究报道,BDNF 可以诱导长时程增强效应(LTP),LTP 是突触可塑性的基础,并被广泛认为是学习记忆的神经生理基础^[16]。由于 BDNF 可以通过血脑屏障,血清中 BDNF 的水平含量与脑中呈正相关。因此外周 BDNF 水平可以反映脑内的 BDNF 水平^[17]。最近许多研究表明,具有认知低下相关疾病的病人血清中 BDNF 水平显著降低^[18-20]。另有研究发现,高血糖对 BDNF 的脑输出具有不利影响,血清 BDNF 水平和 2 型糖尿病病人的空腹血糖呈反比关系^[21]。本实验中,在治疗末期,二甲双胍及金芪高剂量组小鼠血糖浓度均显著降低,血清 BDNF 含量则显著升高。模型组小鼠持续高血糖,其血清 BDNF 水平与正常组比较显著降低,与报道一致。不过目前 BDNF 与认知关系的临床研究还略显不足,BDNF 在认知过程中作用的具体机制显然也还需要更多的研究。

突触结构和功能的变化是学习和记忆的基础。SYN 是一种广泛存在于所有神经突触前囊泡膜上的囊泡吸附蛋白。突触素在突触可塑性及认知功能方面具有重要的作用^[22],与突触功能及结构关系密切,被认为是突触特异性蛋白标记物之一。海马组织 SYN 表达降低会引发认知功能障碍^[23]。有研究

表明, BDNF 与受体 TrkB 结合后可明显促进体外培养的大鼠原代海马神经元中 SYN 的表达迅速上调^[24]。

金芪降糖片是由黄连、黄芪、金银花组成的中成药,具有多组分多靶点协同抗糖尿病的作用^[5],其主要活性成分是小檗碱、黄芪甲苷及绿原酸^[9]。3种活性成分均具有多种生物效应。小檗碱可改善糖尿病引发的认知功能障碍^[10]。有研究报道^[11],小檗碱对转基因阿兹海默症 AD 模型小鼠具有神经保护作用。另有研究报道,小檗碱可改善 STZ 诱导的糖尿病引发的学习记忆障碍,可能是通过调节海马 DG 区突触可塑性和抑制 CA1 区锥体细胞凋亡途径实现的^[25]。黄芪甲苷作为黄芪的主要成分,具有显著的抗氧化作用。被认为是预防伴有认知功能损伤的退行性疾病有前景的药物。据报道,黄芪甲苷具有改善慢性脑缺血大鼠认知功能缺陷的作用,可能是通过抑制海马区神经凋亡和氧化损伤实现的^[12]。孙丽等^[13]发现黄芪注射液可通过增加 BDNF,血管内皮生长因子(VEGF)及 VEGFR2 的表达而抑制细胞凋亡,刺激神经再生,促进受损神经的修复,改善脑缺血再灌注损伤模型大鼠的神经行为功能。绿原酸具有有效的神经保护作用,可改善莨菪碱诱导的记忆缺失模型小鼠的认知损伤^[14]。也有研究报道,绿原酸及其肠道代谢产物均有改善认知障碍的作用^[26]。因此,金芪降糖片可改善糖尿病引发的认知功能障碍,可能是小檗碱、黄芪甲苷及绿原酸 3 种活性成分共同参与完成的。

综上所述,糖尿病小鼠认知功能障碍与 CA1 区海马神经细胞变性、缺失关系密切。金芪降糖片干预治疗后,与模型组比较,小鼠逃避潜伏期明显缩短,说明在一定程度上可以改善学习记忆、空间定向能力,这可能是通过上调脑源性神经营养因子 BDNF,对海马神经细胞保护及营养修复,并促进海马 SYN mRNA 表达上调,调节海马神经突触可塑性途径来实现的。因此,通过有效调节脑源性神经营养因子 BDNF 是金芪降糖片治疗糖尿病引发的认知功能障碍的重要作用机制之一。

[参考文献]

[1] Mijnhout G S, Scheltens P, Diamant M, et al. Diabetic encephalopathy: a concept in need of a definition[J]. Diabetologia, 2006, 49(6): 1447-1448.
[2] 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[J]. Life Sci, 2012, 91(11): 409-

414.
[3] WANG J, Gallagher D, Devito L M, et al. Metformin activates an atypical PKC-CBP pathway to promote neurogenesis and enhance spatial memory formation[J]. Cell Stem, 2012, 11(1): 23-35.
[4] Allard J S, Perez E J, Fukui K, et al. Prolonged metformin treatment leads to reduced transcription of Nrf2 and neurotrophic factors without cognitive impairment in older C57BL/6J mice[J]. Behav Brain Res, 2015, 301: 1-9.
[5] 王月,王涛,吴建霞,等. 金芪降糖片组分体外抗糖尿病的作用及机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(16): 105-109.
[6] 袁怡,张跃明. 中医药治疗糖尿病脑病机理研究[J]. 吉林中医药, 2008, 28(12): 867-868.
[7] 郭健,全志强. 金芪降糖片联用格列吡嗪治疗 2 型糖尿病 100 例临床体会[J]. 天津药学, 2004, 16(6): 33-36.
[8] 邹晨辉,申竹芳. 黄连生物碱抗糖尿病机制的研究[J]. 中草药, 2004, 35(11): 附 2-附 5.
[9] CAO H, REN M, GUO L, et al. JinQi-Jiangtang tablet, a Chinese patent medicine, for pre-diabetes: a randomized controlled trial[J]. Trials, 2010, 11(1): 1-8.
[10] Bhutada P, Mundhada Y, Bansod K, et al. Protection of cholinergic and antioxidant system contributes to the effect of berberine ameliorating memory dysfunction in rat model of streptozotocin-induced diabetes[J]. Behav Brain Res, 2011, 220(1): 30-41.
[11] Durairajan S K, LIU L F, LU J H, et al. Berberine ameliorates β -amyloid pathology, gliosis, and cognitive impairment in an Alzheimer's disease transgenic mouse model [J]. Neurobiol Aging, 2012, 33(12): 2903-2919.
[12] Kim S, KANG I H, Nam J B, et al. Ameliorating the effect of astragaloside IV on learning and memory deficit after chronic cerebral hypoperfusion in rats [J]. Molecules, 2015, 20(2): 1904-1921.
[13] 孙丽,王岭,李艳,等. 黄芪甲苷对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用和机制研究[J]. 中国临床神经科学, 2014, 22(1): 43-49.
[14] Kwon S H, Lee H K, Kim J A, et al. Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice[J]. Eur J Pharmacol, 2010, 649(1): 210-217.
[15] Yulug B, Ozan E, Gönül A S, et al. Brain-derived neurotrophic factor, stress and depression: a minireview

- [J]. *Brain Res Bull*, 2009, 78(6): 267-269.
- [16] Diógenes M J, Costenla A R, Lopes L V, et al. Enhancement of LTP in aged rats is dependent on endogenous BDNF [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2011, 36(9): 1823-1836.
- [17] Karege F, Schwald M, Cisse M. Postnatal developmental profile of brain-derived neurotrophic factor in rat brain and platelets [J]. *Neurosci Lett*, 2002, 328(3): 261-264.
- [18] Ciammola A, Sassone J, Cannella M, et al. Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of Huntington's disease patients [J]. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2007, 144(4): 574-577.
- [19] Gunstad J, Benitez A, Smith J, et al. Serum brain-derived neurotrophic factor is associated with cognitive function in healthy older adults [J]. *J Geriatr Psychiatry Neurol*, 2008, 21(3): 166-170.
- [20] YU H, ZHANG Z, SHI Y, et al. Association study of the decreased serum BDNF concentrations in amnesic mild cognitive impairment and the Val66Met polymorphism in Chinese Han [J]. *J Clin Psychiatry*, 2008, 69(7): 1104-1111.
- [21] Krabbe K S, Nielsen A R, Krogh-Madsen R, et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and type 2 diabetes [J]. *Diabetologia*, 2007, 50(2): 431-438.
- [22] Sze C I, Bi H, Kleinschmidt-DeMasters B K, et al. Selective regional loss of exocytotic presynaptic vesicle proteins in Alzheimer's disease brains [J]. *J Neurol Sci*, 2000, 175(2): 81-90.
- [23] Bittner T, Fuhrmann M, Burgold S, et al. Multiple events lead to dendritic spine loss in triple transgenic Alzheimer's disease mice [J]. *PLoS One*, 2010, 5(11): e15477.
- [24] Tartaglia N, DU J, Tyler W J, et al. Protein synthesis-dependent and-independent regulation of hippocampal synapses by brain-derived neurotrophic factor [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(40): 37585-37593.
- [25] Kalalian-Moghaddam H, Baluchnejadmojarad T, Roghani M, et al. Hippocampal synaptic plasticity restoration and anti-apoptotic effect underlie berberine improvement of learning and memory in streptozotocin-diabetic rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 698(1): 259-266.
- [26] 邢丽娜,周明眉,李云,等. 绿原酸及其肠道代谢产物对中枢神经系统疾病的作用和机制研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(6): 1044-1047.

[责任编辑 周冰冰]