

健脾清化方对糖尿病大鼠认知功能障碍的改善作用

郭秋月¹, 耿艳娜², 韩煦¹, 田静¹, 李捷³, 陈清光^{1*}, 陆灏^{1*}

(1. 上海中医药大学附属曙光医院, 糖尿病研究所, 上海 201203;
2. 河北省中医院, 石家庄 130100; 3. 山东中医药大学医学院, 济南 250355)

[摘要] 目的: 利用2型糖尿病(T2DM)模型大鼠探讨健脾清化方对糖尿病(DM)认知功能障碍的改善作用。方法: 从50只SPF级健康雄性Wistar大鼠中随机挑选10只作为空白组并给予常规饲料喂养, 其余大鼠给予6周高糖高脂饮食, 链脲佐菌素(STZ)诱导建立DM模型。将成模大鼠随机分为模型组、西格列汀组(1.2 g·L⁻¹)、吡格列酮组(0.8 g·L⁻¹)和健脾清化方组(1.3 g·mL⁻¹), 每组10只。连续灌胃6周后, 记录各组大鼠体质量、血糖等相关指标的变化; 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测外周血和脑内肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)和白细胞介素-6(IL-6)的水平; Morris水迷宫实验评估大鼠认知功能; 苏木素-伊红(HE)染色观察海马CA区病理学形态; 免疫组化检测 β 淀粉样蛋白40(A β ₄₀)水平; 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠海马神经元t-tau、磷酸化(p)-tau蛋白表达。结果: 与空白组比较, 模型组大鼠体质量显著下降($P < 0.05$), 血糖水平显著升高($P < 0.01$), TNF- α 、IL-1 β 含量均升高($P < 0.05$), 学习和空间记忆能力显著下降($P < 0.01$), 海马细胞排列疏松紊乱, 细胞间隙明显增大, 细胞数量明显减少, A β ₄₀表达显著升高, 海马中t-tau和p-tau蛋白表达显著增加($P < 0.01$); 与模型组比较, 健脾清化方组大鼠血糖水平显著降低($P < 0.01$), 外周血和脑脊液TNF- α 和IL-1 β 水平降低($P < 0.05$), IL-6呈下降趋势, 但差异无统计学意义, 学习和空间记忆能力显著提高($P < 0.01$), 海马CA1区神经元细胞排列紧密, 数量明显增加, A β ₄₀表达减少, p-tau蛋白表达明显降低($P < 0.05$)。结论: 健脾清化方可能通过降低DM大鼠炎症水平, 减少A β ₄₀沉积导致的神经毒性, 抑制tau蛋白过度磷酸化, 防治DM认知功能障碍。

[关键词] 健脾清化方; 糖尿病; 认知功能障碍; β 淀粉样蛋白; tau蛋白磷酸化

[中图分类号] R2-0; R33; R289; R587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)08-0195-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20230138

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20221228.1840.004.html>

[网络出版日期] 2022-12-29 18:12:19

Amelioration of Cognitive Dysfunction in Diabetic Rats by Jianpi Qinghua Prescription

GUO Qiuyue¹, GENG Yanna², HAN Xu¹, TIAN Jing¹, LI Jie³, CHEN Qingguang^{1*}, LU Hao^{1*}

(1. Diabetes Institute, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shanghai 201203, China;

2. Hebei Provincial Hospital of TCM, Shijiazhuang 130100, China;

3. Medical School, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the amelioration of cognitive dysfunction in diabetes mellitus (DM) by Jianpi Qinghua prescription (JPQH) based on type 2 diabetes (T2DM) model rats. **Method:** Fifty healthy male Wistar rats of SPF grade were randomly divided into control group ($n=10$) and experimental group ($n=40$). The rats in the control group were fed conventionally, while those in the experimental group were fed on a high-

[收稿日期] 2022-08-25

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82074381, 81874434); 上海市科委科研项目(21S21900700); 上海市临床重点专科项目(shslc-zdzk05401); 长三角中医内分泌代谢病专科联盟项目[ZY(2021-2023)-0302]; 上海中医药大学科创项目(YK2021-01-144)

[第一作者] 郭秋月, 在读博士, 从事中医药内分泌及代谢性疾病研究, E-mail: 13708935269@163.com

[通信作者] * 陆灏, 主任医师, 博士生导师, 从事中医药内分泌及代谢性疾病研究, E-mail: luhao20210824@163.com;

* 陈清光, 副主任医师, 硕士生导师, 从事中医药内分泌及代谢性疾病研究, E-mail: luhao20210824@163.com

sugar, high-fat diet for six weeks and administered with streptozotocin (STZ) for the induction of the DM model. The model rats were randomly divided into model group, sitagliptin group ($1.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), pioglitazone group ($0.8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), and JPQH group ($1.3 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$), with 10 rats in each group. After six weeks of drug intervention, the changes in body weight, blood glucose, and other related indexes of each group were recorded. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to detect the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), and interleukin-6 (IL-6) in the peripheral blood and brain. The Morris water maze test was used to evaluate the cognitive function in rats. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological morphology of the hippocampal CA region. The amyloid β -protein 40 ($A\beta_{40}$) level was detected by immunohistochemistry. The protein expression of t-tau and p-tau in hippocampal neurons of rats was detected by Western blot. **Result:** Compared with blank group, the body weight of model group was significantly decreased ($P<0.05$), blood glucose level was significantly increased ($P<0.01$), inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β were increased ($P<0.05$), learning and spatial ability were significantly decreased ($P<0.01$), the arrangement of hippocampal cells was loose and disordered, and the intercellular space was significantly increased. The number of cells decreased significantly, and the expression of $A\beta_{40}$ increased significantly. and increased t-tau and p-tau protein content in the hippocampus ($P<0.01$). Compared with model group, the JPQH group showed reduced blood glucose ($P<0.01$), decreased TNF- α and IL-1 β levels in the peripheral blood and cerebrospinal fluid ($P<0.05$), a downward trend of IL-6 without a statistical difference, improved learning and spatial memory ability ($P<0.01$), densely arranged cells in the hippocampal CA1 area, increased cell number, reduced $A\beta_{40}$ expression, and decreased p-tau protein expression ($P<0.05$). **Conclusion:** JPQH can prevent cognitive dysfunction in DM by reducing inflammatory factor levels, decreasing neurotoxicity caused by $A\beta_{40}$ deposition, and inhibiting hyperphosphorylation of tau protein in DM rats.

[Keywords] Jianpi Qinghua prescription; diabetes mellitus; cognitive dysfunction; amyloid β -protein; tau protein phosphorylation

2型糖尿病(T2DM)是一种慢性低度炎症反应,主要表现为胰岛 β 细胞功能受损和胰岛素抵抗。长期持续性高血糖会导致机体多组织器官损伤,除了肾脏、视网膜、骨骼肌、足部等还包括中枢神经系统,造成脑部神经元细胞损伤,引起患者认知功能障碍,形成糖尿病脑病(DE),主要表现为认知功能障碍和大脑神经结构及功能的改变^[1]。基于人群的队列研究表明,糖尿病患者发生痴呆的风险增加,且糖尿病发病年龄越小,痴呆的患病风险越低^[2]。目前关于本病的机制尚未完全明确,可能与长期高血糖环境导致脑内炎症水平增加;胰岛素抵抗引起神经元外 $A\beta$ 沉积,产生神经毒性损伤大脑;神经元内tau蛋白过度磷酸化产生神经元纤维缠结(NFTs)等有关^[3]。早期防治糖尿病认知功能障碍成了国内外研究本病的重点与难点。

近年来,临床实践及研究发现中医药及中药复方对糖尿病认知功能障碍有很好的保护作用^[4-5]。健脾清化方是上海中医药大学附属曙光医院内分泌科长期临床实践总结出来的经验方,化裁于李东垣的《脾胃论》首方“补脾胃泻阴火升阳汤”,由党

参、黄芪、山药、黄精、黄连、黄芩、葛根和鬼箭羽组成。临床回顾性研究发现,健脾清化方降低了T2DM患者轻度认知功能障碍(MCI)的患病率,但尚未通过体内实验证实。本研究使用高糖高脂饲料联合链脲佐菌素(STZ)构建DM模型大鼠,观察健脾清化方对T2DM大鼠糖代谢、炎症因子及脑脊液标志蛋白表达的影响,进一步探讨其改善认知功能障碍防治T2DM可能的机制。

1 材料

1.1 动物 SPF级健康雄性Wistar大鼠50只,体重180~200 g,6~8周龄,购于北京维通利华动物有限责任公司,动物合格证号SCXK(京)2021-0011,饲养于上海中医药大学实验动物中心,实验动物使用许可证号SYXK(沪)2020-0009。标准饲料适应性喂养1周,室温18~20℃,湿度60%~70%,12 h昼夜节律,空气流通,自由摄食、饮水。本次实验通过上海中医药大学动物伦理委员会的审批,审批号pzshutcm201211013。

1.2 药物及制备 健脾清化方组成:党参15 g、黄芪15 g、山药15 g、黄精15 g、黄连3 g、黄芩9 g、葛根

15 g、鬼箭羽 15 g。药材购自雷云商药房(中国上海),由上海中医药大学附属曙光医院药学部徐广林博士鉴定。中药材符合2020年版《中华人民共和国药典》标准要求。药物委托上海中医药大学附属曙光医院制剂科制备,将上述8种药材浸入1 000 mL蒸馏水中,在陶瓷罐中于100℃下提取30 min,连续搅拌2次。将混合提取物在100℃浓缩30 min,4℃下以13 000 r·min⁻¹离心30 min(离心半径6 cm,下同),然后将上清液过筛直至质量浓度为1.3 g·mL⁻¹的药物^[7],分装后保存于4℃冰箱备用。西格列汀(杭州默沙东制药有限公司,批号S025217)和吡格列酮(江苏德源药业股份有限公司,批号16021552)碾碎后溶于双蒸水中制成质量浓度为12 g·L⁻¹和0.8 g·L⁻¹的悬浊液,现配现用。

1.3 试剂 SPF级高糖高脂饲料(配方为20.0%炼猪油、10.0%蔗糖和70.0%普通饲料,由上海中医药大学实验动物中心提供)。链脲佐菌素(STZ,美国Sigma公司,批号1000641700);柠檬酸钠(天津致远公司,批号2020010203);柠檬酸(天津鼎盛鑫公司,批号2020-01-19);苏木素-伊红(HE)染液(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号G1003);肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(武汉华美生物工程有限公司,货号分别为CSB-E09315h、CSB-E08053h、CSB-E12899B);总tau蛋白(t-tau)、磷酸化tau蛋白(p-tau)、内参 β -肌动蛋白(β -actin)、免疫球蛋白G(IgG)抗体(英国Abcam,货号分别为ab76128、ab32057、ab8227、ab6721)。

1.4 仪器 Accu-chek型血糖仪(德国Roche公司),Ethovision水迷宫视频跟踪分析系统(荷兰Noldus公司),Z-216MK型离心机(德国Hermle公司),ELx800型酶标仪(美国BioTek公司),NanoDrop 2000/2000c型分光光度计(美国Thermo公司),SMZ1000型光学电子显微镜(日本Nikon公司),KZ-III-F型高速低温组织研磨仪(武汉赛维尔生物科技有限公司),Mini型蛋白电泳系统、GelDoc XR型凝胶成像分析系统(美国Bio-Rad公司),5200型全自动化学发光图像分析系统(上海天能公司)。

2 方法

2.1 模型制备 从50只SPF级雄性Wistar大鼠中随机挑选10只作为空白组并给予常规饲料喂养,其余大鼠给予高脂饲料喂养。参照文献^[6]方法,6周后大鼠禁食不禁水12 h,称体质量,造模组大鼠一次性腹腔内注射STZ(25 mg·kg⁻¹,溶于由柠檬酸钠和

柠檬酸配制成的0.1 mmol·L⁻¹柠檬酸缓冲液中,pH 4.5,终体积分数为4%,冰浴,现配现用,20 min内用完)。正常组大鼠按10 mL·kg⁻¹剂量腹腔注射柠檬酸缓冲液(0.1 mmol·L⁻¹,pH 4.5)。72 h后造模组大鼠尾静脉采血,测量空腹血糖(FBG),连续测量2次FBG \geq 16.7 mmol·L⁻¹为造模成功^[8-9]。

2.2 分组及给药 将造模成功大鼠采用随机数字表法分为模型组、西格列汀组、吡格列酮组和健脾清化方组(每组10只)。为比较健脾清化方与噻唑烷二酮(TZD)类和二肽基肽酶-4(DPP-4)类降糖药物的疗效,设立西格列汀组和吡格列酮组两个西药对照组。处方剂量健脾清化方共计102 g·d⁻¹,吡格列酮片15 mg·d⁻¹,西格列汀100 mg·d⁻¹,根据大鼠与人的体表面积,中药剂量和西药剂量均按成人每日剂量的6.17倍灌胃^[10],人按50 kg,则人的中药用药剂量为102 g/50 kg=2.04 g·kg⁻¹,大鼠的中药用药剂量为2.04 g·kg⁻¹×6=12.24 g·kg⁻¹,吡格列酮用药剂量为15 mg/50 kg×6=1.8 mg·kg⁻¹,西格列汀用药剂量为100 mg/50 kg×6=12 mg·kg⁻¹,模型组给予等体积双蒸水。根据预实验结果,所选中药浓度为最适宜剂量。各组大鼠均自由饮水,共灌胃6周。

2.3 Morris水迷宫实验 各组大鼠给药结束后分别进行水迷宫测试评估大鼠认知功能。实验器材由圆形水池和ETHOVISION水迷宫视频跟踪分析系统两部分组成。首先进行定位航行实验:随机选择一个入水点入水(4次分别从4个象限入水),将大鼠面向池壁放入水中,迫使大鼠学习寻找设于水面以下的平台。记录120 s内寻找平台所需时间(潜伏期)。如果大鼠入水120 s内未找到平台,则将其引导至平台,并在平台停留60 s,潜伏期记录为120 s。定位航行实验结束后撤除平台,进行空间探索实验:任选一个入水点将大鼠面向池壁放入水中,记录120 s内跨越原平台位置的次数。

2.4 取材 实验结束,大鼠禁食8 h后称体质量,麻醉后取仰卧位固定,沿腹正中线打开腹腔,腹主动脉取血3 mL,3 000 r·min⁻¹离心10 min,分离血清,使用微量移液枪收集上清液移入不同编号离心管,-80℃冰箱保存备用。行左心室生理盐水200 mL持续灌洗,至右心耳流出清亮液体后,断头取脑,分离双侧海马,部分以4%多聚甲醛固定,用于石蜡切片;部分以液氮保存,用于蛋白免疫印迹法(Western blot)等实验。脑组织匀浆的制备:取材后,迅速将头部置于冰盘上取脑,去掉嗅球、小脑和低位脑干,然后将患侧大脑半球在4℃以下用生理

盐水制成10%组织匀浆备用。

2.5 指标检测

2.5.1 大鼠给药前后体质量及FBG变化 体质量:每周给大鼠称重并记录治疗前后体质量变化;FBG:大鼠禁食不禁水12 h,采用尾静脉取血法使用罗氏血糖仪检测并记录大鼠治疗前后FBG水平。

2.5.2 ELISA检测血清及脑组织炎症因子水平 行为学实验结束后,按ELISA试剂盒说明,检测血清及脑组织内TNF- α 、IL-1 β 、IL-6因子的含量。

2.5.3 HE染色观察海马区神经元病理形态 取大鼠海马组织切割成1 mm³组织块,用2.5%的戊二醛固定液固定2 h,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗。进行梯度脱水、二甲苯透明后石蜡包埋,取海马冠状位切片,厚度4 μ m,60~62 $^{\circ}$ C烘干后用HE染色封固,镜下观察大鼠海马CA区神经元细胞的形态结构。

2.5.4 免疫组化观察大鼠海马A β 水平 将固定好的脑组织进行石蜡包埋,连续冠状切片,脱水、灭火内源性酶、热修复后封闭,滴加A β 一抗(稀释倍数为1:1 000),4 $^{\circ}$ C过夜,二抗(稀释倍数1:1 000)37 $^{\circ}$ C孵育20 min,DAB显色,苏木素复染。荧光显微镜拍照观察,利用Image-pro Plus 6.0图像分析系统测定各组大鼠海马CA区各5个高倍视野(400 \times)下阳性细胞数。

2.5.5 Western blot检测t-tau及p-tau蛋白表达 取

各组大鼠脑部前额叶,加入RIPA裂解,离心(4 $^{\circ}$ C、12 000 r \cdot min⁻¹,20 min),取上清液加入蛋白上样缓冲液,混匀后100 $^{\circ}$ C水浴10 min直至蛋白变性,BCA定量蛋白浓度,取蛋白40 μ g通过10%的SDS-PAGE电泳,分离后转至PVDF膜,封闭后经t-tau、p-tau、 β -actin兔抗鼠抗体(稀释倍数1:5 000)4 $^{\circ}$ C孵育过夜。室温下孵育羊抗兔IgG二抗(稀释倍数1:5 000)1 h,利用Pharos FX激光成像系统及Quantity one图像处理分析软件处理图像,Image J 1.8.0进行目的条带灰度值/ β -actin条带灰度值的检测以确定其相对表达量。

2.6 统计学方法 采用SPSS 23.0统计软件处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用t检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对DM大鼠体质量、FBG水平的影响 干预前,各造模组大鼠FBG均 ≥ 16.7 mmol \cdot L⁻¹,与空白组比较,差异具有统计学意义($P < 0.01$),提示DM大鼠造模成功。治疗后,与空白组比较,模型组大鼠体质量明显降低($P < 0.05$),FBG水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,健脾清化方组大鼠体质量明显上升,FBG明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表1 健脾清化方(JPQH)对DM大鼠体质量、FBG水平的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Effect of JPQH on body weight and FBG of DM rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

| 组别 | 剂量/g \cdot kg ⁻¹ | 体质量/g | | FBG/mmol \cdot L ⁻¹ | |
|--------|-------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| | | 治疗前 | 治疗后 | 治疗前 | 治疗后 |
| 空白组 | | 409.76 \pm 18.92 | 435.67 \pm 20.91 | 4.23 \pm 2.79 | 4.30 \pm 0.37 |
| 模型组 | | 360.50 \pm 25.09 ²⁾ | 349.00 \pm 19.51 ¹⁾ | 20.40 \pm 2.46 ²⁾ | 21.33 \pm 2.65 ²⁾ |
| 西格列汀组 | 1.2 \times 10 ⁻² | 359.60 \pm 30.44 | 383.70 \pm 22.38 ³⁾ | 19.87 \pm 2.24 ²⁾ | 10.16 \pm 3.06 ³⁾ |
| 吡格列酮组 | 1.8 \times 10 ⁻³ | 355.40 \pm 35.11 | 359.60 \pm 37.92 ³⁾ | 20.90 \pm 2.7 ²⁾ | 11.35 \pm 1.22 ³⁾ |
| 健脾清化方组 | 12.24 | 358.11 \pm 37.60 | 389.29 \pm 30.29 ³⁾ | 20.15 \pm 3.29 ²⁾ | 13.21 \pm 0.86 ³⁾ |

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$ (表2同)

3.2 对大鼠行为学指标的影响 定位航行实验显示,与空白组比较,模型组大鼠的逃避潜伏期除第1天外均明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,健脾清化方组大鼠在1、4 d的逃避潜伏期明显缩短($P < 0.05$),西格列汀组大鼠2~4 d的潜伏期减少($P < 0.05$),吡格列酮组大鼠潜伏期只在4 d时减少($P < 0.05$)。空间探索实验显示,与空白组比较,模型组大鼠120 s内穿越平台次数显著减少($P < 0.01$);与模型组比较,3个治疗组大鼠120 s内穿越平台次数明显增加($P <$

0.05),3组之间差异无统计学意义。见表2。

3.3 对大鼠血清和脑组织炎症因子的影响 与空白组比较,模型组大鼠TNF- α 、IL-1 β 及IL-6炎症因子均明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,吡格列酮组大鼠血清和脑组织TNF- α 水平均明显下降($P < 0.05$),IL-6也呈下降趋势,但差异无统计学意义,西格列汀组TNF- α 和IL-1 β 水平明显降低($P < 0.05$),健脾清化方组大鼠血清TNF- α 、IL-1 β 和脑组织内IL-1 β 水平明显下降($P < 0.05$)。见表3。

表2 JPQH对DM大鼠逃避潜伏期及穿越平台次数的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of JPQH on incubation periods and number of platform crossings in DM rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | 逃避潜伏期/min | | | | | 穿越平台次数/次 |
|--------|-----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|
| | | 1 d | 2 d | 3 d | 4 d | 5 d | |
| 空白组 | | 58.95±15.36 | 25.44±11.43 | 16.94±5.07 | 13.93±3.29 | 7.62±1.41 | 2.23±0.51 |
| 模型组 | | 64.81±18.22 | 54.90±11.97 ¹⁾ | 35.94±10.01 ¹⁾ | 40.69±11.66 ¹⁾ | 19.55±8.17 ¹⁾ | 1.10±0.44 ²⁾ |
| 西格列汀组 | 1.2×10 ⁻² | 63.00±14.97 | 34.45±15.17 ³⁾ | 27.30±9.46 ³⁾ | 19.00±8.79 ³⁾ | 14.47±7.17 | 1.83±0.33 ³⁾ |
| 吡格列酮组 | 1.8×10 ⁻³ | 59.35±18.09 | 43.80±14.03 | 32.10±14.38 | 14.63±6.20 ³⁾ | 13.39±5.09 | 1.72±0.14 ³⁾ |
| 健脾清化方组 | 12.24 | 43.14±16.50 ³⁾ | 50.10±23.73 | 27.67±11.08 | 15.00±7.67 ³⁾ | 10.21±3.83 | 1.77±0.10 ³⁾ |

表3 JPQH对DM大鼠血清及脑组织炎症水平的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

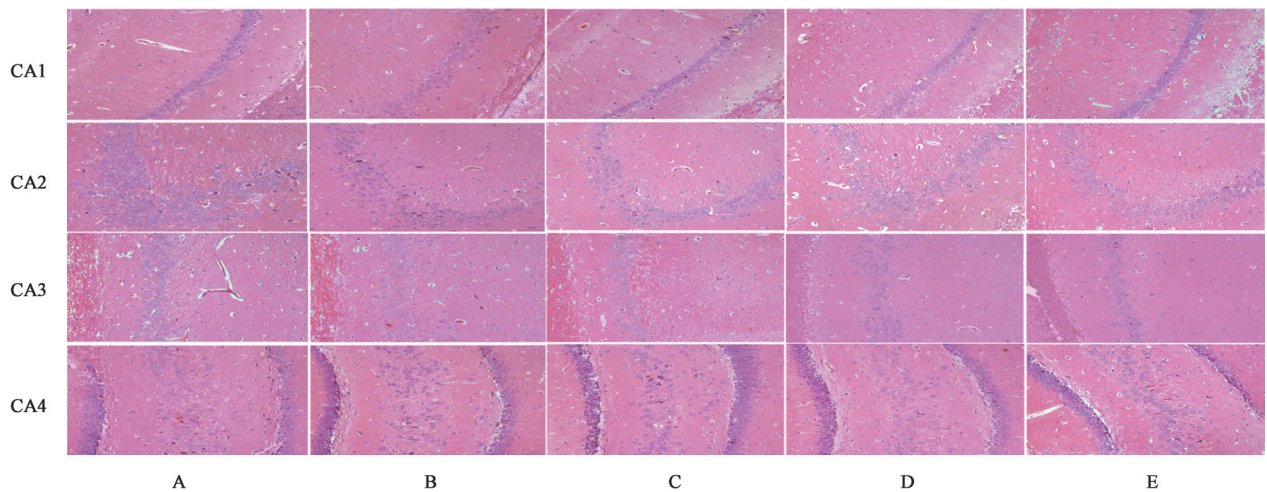
Table 3 Effect of JPQH on level of inflammation in peripheral blood and brain tissue of DM rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | 血清 | | | 脑组织 | | |
|--------|-----------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | | TNF- α | IL-1 β | IL-6 | TNF- α | IL-1 β | IL-6 |
| 空白组 | | 6.10±1.30 | 13.11±3.66 | 16.07±1.23 | 6.23±0.89 | 6.93±1.90 | 74.54±5.71 |
| 模型组 | | 9.13±2.82 ¹⁾ | 21.21±4.77 ¹⁾ | 23.25±1.98 ¹⁾ | 10.89±3.67 ¹⁾ | 16.26±5.21 ¹⁾ | 95.72±14.97 ¹⁾ |
| 西格列汀组 | 1.2×10 ⁻² | 6.86±1.14 | 16.19±4.36 | 24.15±1.60 | 6.66±1.57 ²⁾ | 9.77±2.19 ²⁾ | 90.60±15.00 |
| 吡格列酮组 | 1.8×10 ⁻³ | 5.97±1.04 ²⁾ | 16.54±5.10 | 21.69±1.70 | 6.20±1.40 ²⁾ | 8.98±6.63 | 90.64±14.97 |
| 健脾清化方组 | 12.24 | 4.08±0.93 ²⁾ | 13.29±4.04 ²⁾ | 25.28±6.61 | 7.87±1.51 | 7.20±3.94 ²⁾ | 100.41±18.18 |

注:与空白组比较¹⁾P<0.05;与模型组比较²⁾P<0.05

3.4 对大鼠脑组织病理学形态的影响 DM大鼠海马CA各区HE染色结果显示,空白组大鼠海马CA各区神经元细胞排列整齐紧密,细胞形态完整,细胞间界限明显,细胞核染色清晰,呈不规则圆形;模型组大鼠的海马细胞排列疏松紊乱,形态不完

整,细胞间隙明显增大,细胞数量明显减少。与DM大鼠比较,各治疗组神经元细胞形态有所改善,细胞排列尚整齐密集,细胞间界限较明显,核染清晰,细胞形态较为完整,细胞数量有所增多,其中海马CA1区较明显。见图1。



注:A.正常组;B.模型组;C.西格列汀组;D.吡格列酮组;E.健脾清化方组(图2同)

图1 JPQH对DM鼠海马CA区神经元细胞形态的影响(HE,×200)

Fig. 1 Effect of JPQH on neuronal cell morphology in hippocampal CA region of DM rats (HE, ×200)

3.5 对大鼠脑脊液A β_{42} 表达的影响 镜下观察可见A β_{42} 阳性表达物为棕褐色颗粒,主要分布在皮层、海马神经元胞浆中,多呈戒指环样。空白组大鼠海马区细胞排列紧密,胞体小,A β_{42} 着色浅,表达较弱;

与空白组比较,模型组大鼠海马区细胞排列疏松,胞体较大,A β_{42} 在胞质中着色较深,呈强阳性表达;与模型组比较,健脾清化方组细胞排列相对紧密,胞体较小,胞浆中A β_{42} 的染色较浅。见图2。

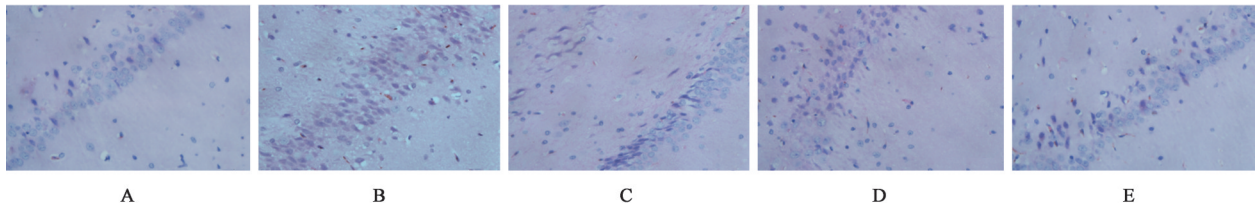
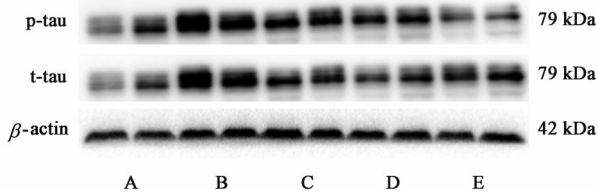


图2 JPQH对DM大鼠大脑海马区Aβ水平的影响(免疫组化,×400)

Fig. 2 Effect of JPQH on Aβ levels in hippocampal region of DM rat brain (IHC, ×400)

3.6 对大鼠海马组织 t-tau、p-tau 蛋白表达的影响

与空白组比较,模型组大鼠海马中 t-tau 和 p-tau 蛋白表达显著增加($P<0.01$);与模型组比较,健脾清化方组 t-tau 蛋白含量有下降趋势,但差异无统计学意义,而 p-tau 蛋白显著降低($P<0.01$)。见图3、表4。



注:A.正常组;B.模型组;C.吡格列酮组;D.西格列汀组;E.健脾清化方组

图3 DM大鼠海马神经细胞内tau蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of tau protein expression in hippocampal neurons of DM rats

表4 JPQH对DM大鼠海马p-tau、t-tau蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 4 Effect of JPQH on p-tau and t-tau protein expression in hippocampal neurons of DM rats ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

| 组别 | 剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ | p-tau/ β -actin | t-tau/ β -actin |
|--------|-----------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 空白组 | | 0.57±0.11 | 0.50±0.21 |
| 模型组 | | 1.51±0.05 ¹⁾ | 1.35±0.16 ¹⁾ |
| 西格列汀组 | 1.2×10^{-2} | 0.84±0.09 ²⁾ | 0.81±0.06 ²⁾ |
| 吡格列酮组 | 1.8×10^{-3} | 0.88±0.06 ²⁾ | 0.72±0.15 ²⁾ |
| 健脾清化方组 | 12.24 | 0.62±0.02 ³⁾ | 0.14±0.09 |

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$

4 讨论

糖尿病认知功能障碍早期主要表现为学习和记忆力下降^[11]。疾病初始不易被诊断,发现后大多进展至认知障碍甚至痴呆阶段,至今缺少精准靶向的药物。因此本病的防治重点在于通过降低血糖,减少血糖波动,降低炎症反应,减少对脑血管的损害,预防认知障碍的发生。课题组在以往研究过程中发现,中药干预的糖尿病大鼠在实验过程中较其他组大鼠反应敏捷,为此课题组专门开展了关于糖尿病认知功能障碍的相关实验。临床研究表明确,健脾清化方对糖尿病患者具有很好的降糖效

果,且与不服用中药的患者比较,服用健脾清化方的糖尿病患者认知功能障碍的患病率明显下降^[12]。本研究通过体内实验,证实了健脾清化方能明显改善糖尿病大鼠的血糖水平,降低外周血和脑组织炎症反应,改善大脑海马区神经元细胞的形态结构,减少糖尿病大鼠脑内Aβ蓄积,抑制了tau蛋白过度磷酸化,改善了糖尿病大鼠的认知功能障碍。

健脾清化方出自李东垣的经典名方“补脾胃泻阴火升阳汤”,也是上海中医药大学附属曙光医院内分泌科长期用药总结的临床验方。方中党参可有效改善糖原合成酶激酶-3β(GSK-3β)活性升高所诱导的大鼠认知功能障碍,其可能机制与下调GSK-3β活性,进而抑制tau蛋白过度磷酸化、促进神经元发育有关^[13]。药理学预分析表明酒蒸黄连可能通过调节糖代谢、改善胰岛素抵抗、抑制炎症因子表达、抗神经细胞凋亡以及调控磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)、糖基化终末产物(AGE)/AGE受体(RAGE)、胰岛素、胆碱能等相关通路,发挥治疗糖尿病及其并发的认知功能障碍作用,动物实验验证与预测结果一致^[14]。黄芪甲苷可能通过抑制小胶质细胞活化介导的神经炎症反应,降低AD小鼠脑内海马区TNF-α、IL-1β含量,改善AD小鼠的学习记忆功能^[15]。上述实验结论与本研究结果一致,提示健脾清化方可能是多途径、多环节改善糖尿病大鼠海马神经细胞功能,抑制tau蛋白过度磷酸化,减少Aβ沉积等的药理作用。

既往研究表明,Aβ沉积促进了糖尿病认知功能障碍的发生发展。Aβ是淀粉样前体蛋白(APP)在体内代谢生成的氨基酸残基蛋白质,具有高度聚集力^[16]。Aβ蛋白积蓄及其神经毒性被普遍认为是阿尔兹海默病(AD)发病的中心机制,其在内侧顶叶皮质中的沉积是AD发展的第一阶段^[17]。数据显示,与AD小鼠比较,β-细辛醚(石菖蒲的有效活性成分)干预后的小鼠脑中Aβ沉积显著减少,AD的特征性病理表现明显改善^[18]。当归芍药散可提高痴呆大鼠的学习和记忆能力,减轻海马组织结构的损伤,其生物学作用可能与降低脑脊液中Aβ₁₋₄₂和tau

蛋白的水平有关^[19]。上述结果与本次研究结果相符,本次研究通过水迷宫实验提示,与空白组比较,模型组大鼠存在认知功能障碍,免疫组化显示其大脑海马区神经元细胞A β 表达增多。此外,研究发现通过减少A β 蛋白蓄积改善神经元细胞损伤,可能与PI3K/Akt、核转录因子(NF)- κ B、凋亡通路及Ca⁺通道等有关。有体外实验发现当归芍药散可能通过反应元件结合蛋白(CREB)/B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)信号通路显著增加A β 诱导的胆碱能神经元存活率,改善A β 诱导的胆碱能神经元凋亡,降低胱天蛋白酶-3(Caspase-3)活化水平^[20]。数据表明,与模型组比较,金雀异黄酮极显著提高了A β_{25-35} 所致海马神经元损伤模型中细胞的存活率,其途径可能与Ca²⁺-钙调蛋白依赖性蛋白激酶IV(CaMKIV)通路有关^[21]。江曦等^[22]发现通过激活PI3K/Akt通路,促进GSK-3 β 磷酸化,并抑制海马神经元细胞凋亡可保护大鼠海马神经元免受A β 积聚导致的损伤。同样的,抑制NF- κ B p65信号通路活化也可降低A β_{1-42} 诱导的海马神经炎症和神经元凋亡^[23]。在此基础上课题组认为,健脾清化方可能通过调节APP代谢或其他途径,减少了A β 的产生和蓄积,降低了神经毒性,改善了大鼠海马神经元的结构与功能。

高糖环境下,A β 蓄积和炎症反应在糖尿病大鼠海马区神经元细胞中并存且相互作用^[24]。有研究发现,在AD患者中A β 沉积可以诱导血管内皮细胞发生炎症反应,而炎症反应又能促进A β 沉积^[25]。研究发现,通过抑制炎症通路NF- κ B减少炎症因子TNF- α 蛋白表达和A β 蛋白的沉积,糖尿病小鼠的学习记忆能力明显改善^[26]。类似的,梁静等^[27]发现,抑制NF- κ B信号通路激活会降低A β_{25-35} 诱导的神经细胞PC12分泌的炎症因子水平。低剂量酸枣仁汤显著抑制了血清和海马中IL-6、IL-1 β 和TNF- α 炎症因子的浓度,显著改善了APP/PS1小鼠的认知障碍,神经元丢失和A β 斑块沉积减少^[28]。本次实验结果也验证了这一点,模型组大鼠神经元A β 斑块蓄积,外周血和脑内炎症因子(TNF- α 、IL-1 β)水平增加,经健脾清化方治疗后A β 聚集减少,外周血和脑内炎症水平下降,大鼠的潜伏期和穿越平台次数缩短,认知功能障碍明显改善,表明降低炎症反应也是健脾清化方治疗糖尿病认知功能障碍的重要疗效之一。

认知功能障碍主要表现为学习能力和记忆能力的下降^[29]。本实验采用Mirrors水迷宫实验,通过定位航行实验和空间探索实验,分别评估糖尿病大

鼠对空间的学习能力和记忆能力。本实验首次通过水迷宫实验发现健脾清化方对糖尿病大鼠的认知功能具有明显的改善作用。此外,海马区是主要负责学习和记忆功能的脑区,CA1区神经元具有明显的海马信号输出环路,在长时程记忆和相对空间任务及行为学上具有重要研究意义^[30]。HE染色结果显示,糖尿病大鼠海马CA1区神经元细胞受损严重,经药物干预后细胞形态改善明显,其中健脾清化方对细胞的改善作用较TZD组明显。这与以往研究具有一致性。研究表明,与糖尿病小鼠比较,中西医结合治疗组小鼠脑海马CA1区中神经细胞排列整齐,形态较完整,核染色清晰,细胞间界限清楚^[31]。本研究说明中药通过改善海马区,主要是CA1区神经元细胞形态结构,增加细胞数量来增强糖尿病大鼠认知能力,进一步研究或可考虑中药对海马CA1区蛋白表达及炎症水平的影响。

综上所述,本实验主要研究了健脾清化方对糖尿病大鼠血糖、炎症水平、脑脊液蛋白表达的调节以及对海马区神经元细胞的保护作用。实验结果显示,糖尿病大鼠存在较为明显的认知功能障碍,与既往文献报道一致;本实验首次在水迷宫实验中证明中药健脾清化方对糖尿大鼠认知功能有较好的保护作用,其作用机制与其降糖、抗炎症、抑制A β 沉积、降低tau过度磷酸化、改善海马CA区神经元细胞形态等作用有关。本研究为糖尿病认知功能障碍的研究提供了研究思路,深入研究其上述作用相关的蛋白及通路表达,探查其蛋白分子水平的可能机制,以期为本病患者带来福音,为祖国医学防治糖尿病脑病提供新的研究方向。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] CHEN R, SHI J, YIN Q, et al. Morphological and pathological characteristics of brain in diabetic encephalopathy[J]. J Alzheimers Dis, 2018, 65(1): 15-28.
- [2] BARBIELLINI AMIDEI C, FAYOSSE A, DUMURGIER J, et al. Association between age at diabetes onset and subsequent risk of dementia[J]. JAMA, 2021, 325(16): 1640-1649.
- [3] KATZMARSKI N, ZIEGLER-WALDKIRCH S, SCHEFFLER N, et al. A β oligomers trigger and accelerate A β seeding[J]. Brain Pathol, 2020, 30(1): 36-45.
- [4] 章梦玲,蔡明,夏文文,等. 桃红四物汤对糖尿病脑病大鼠认知功能的保护作用[J]. 安徽中医药大学学

- 报, 2022, 41(3): 64-70.
- [5] 李全, 贾斯婷, 关慧波. 地黄饮子辅助治疗肾虚髓减型2型糖尿病合并轻度认知功能障碍的临床疗效观察[J]. 时珍国医国药, 2022, 33(2): 410-412.
- [6] 韩煦, 姚政, 李俊燕, 等. 健脾清化方对2型糖尿病大鼠肠道免疫细胞Th1/Th2/Th17/Treg的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2019, 46(7): 1532-1534, 1570.
- [7] LIU Y, HAN X, CAI M, et al. Jianpi Qinghua formula alleviates insulin resistance via restraining of MAPK pathway to suppress inflammation of the small intestine in DIO mice [J]. BMC Complement Med Ther, 2022, 22(1): 129.
- [8] SUN Y, SHI H, YIN S, et al. Human mesenchymal stem cell derived exosomes alleviate type 2 diabetes mellitus by reversing peripheral insulin resistance and relieving β -cell destruction [J]. ACS Nano, 2018, 12(8): 7613-7628.
- [9] REED M J, MESZAROS K, ENTES L J, et al. A new rat model of type 2 diabetes: The fat-fed, streptozotocin-treated rat [J]. Metabolism, 2000, 49(11): 1390-1394.
- [10] 赵伟, 孙国志. 不同种实验动物间用药量换算[J]. 畜牧兽医科技信息, 2010, doi:10. 3969/J. ISSN. 1671-6027. 2010. 05. 032.
- [11] BELLIA C, LOMBARDO M, MELONI M, et al. Diabetes and cognitive decline [J]. Adv Clin Chem, 2022, 108: 37-71.
- [12] 刘亚华, 韩煦, 金燊懿, 等. 健脾清化方调控RasGRP1/p38 MAPK 通路影响肠道通透性对高脂饮食诱导肥胖小鼠胰岛素抵抗的改善作用[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(5): 2647-2651.
- [13] 罗洪斌, 刘翔宇, 牟南樵, 等. 板桥党参对激活GSK-3 β 诱导的AD模型大鼠认知功能障碍的保护作用及其机制[J]. 中国药理学通报, 2017, 33(8): 1060-1067.
- [14] 李思颖, 李佳川, 宋琴, 等. 基于“关键成分-潜在靶点-核心通路”交互网络的酒蒸黄连生物碱-石菖蒲挥发油配伍防治糖尿病认知功能障碍机制研究[J]. 中草药, 2021, 52(19): 5910-5921.
- [15] 李娟, 常子嵩, 姚遥, 等. 黄芪甲苷对阿尔茨海默病小鼠模型认知功能和脑内神经炎症的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2018, 34(6): 597-601.
- [16] GUO Y, WANG Q, CHEN S, et al. Functions of amyloid precursor protein in metabolic diseases [J]. Metabolism, 2021, 115: 154454.
- [17] JAGUST W. Imaging the evolution and pathophysiology of Alzheimer disease [J]. Nat Rev Neurosci, 2018, 19(11): 687-700.
- [18] 牛康, 陈瑶, 肖妍妍, 等. β -细辛醚对AD小鼠脑中A β 沉积的影响[J]. 合肥工业大学学报: 自然科学版, 2022, 45(4): 561-564.
- [19] 李彬, 周喜燕, 王群, 等. 当归芍药散对血管性痴呆模型大鼠认知功能的影响及机制[J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2022, 31(6): 499-505.
- [20] 李泽, 尹芳, 杨苗, 等. 基于CREB/Bcl-2信号通路探究当归芍药散改善A β 诱导的胆碱能神经元凋亡的作用机制[J]. 中草药, 2022, 53(8): 2376-2382.
- [21] 高华武, 王艳, 周鹏, 等. 金雀异黄酮通过调控Ca²⁺-CaMKIV通路对A β_{25-35} 诱导海马神经元损伤的保护作用[J]. 食品科学, 2021, 42(13): 121-126.
- [22] 江曦, 邵玉萍. 不同负荷有氧运动调控PI3K/Akt信号通路改善A β 沉积导致的海马神经元损伤[J]. 体育教育学报, 2022, 38(3): 89-94.
- [23] 邵晓洁, 管文婕, 洪占梅, 等. 大豆异黄酮通过NF- κ B p65信号通路抑制A β_{1-42} 诱导的海马神经炎症和凋亡[J]. 中国药理学通报, 2022, 38(6): 874-879.
- [24] TEJERA D, MERCAN D, SANCHEZ-CARO J M, et al. Systemic inflammation impairs microglial A β clearance through NLRP3 inflammasome [J]. EMBO J, 2019, 38(17): e101064.
- [25] XIE L, ZHANG N, ZHANG Q, et al. Inflammatory factors and amyloid β -induced microglial polarization promote inflammatory crosstalk with astrocytes [J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(22): 22538-22549.
- [26] 郑愉心, 赵嘉培, 刘欢欢, 等. 通督启神针法对APP/PS1小鼠学习记忆行为及海马A β 沉积、炎症因子的影响[J]. 针灸临床杂志, 2022, 38(4): 55-60.
- [27] 梁静, 陈汉仁, 蒋静子, 等. lncRNA-BC200调控A β_{25-35} 诱导的神经细胞PC12炎症因子表达和细胞凋亡[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(5): 403-409.
- [28] LONG Q H, WU Y G, HE L L, et al. Suan-Zao-Ren decoction ameliorates synaptic plasticity through inhibition of the A β deposition and JAK2/STAT3 signaling pathway in AD model of APP/PS1 transgenic mice [J]. Chin Med, 2021, 16(1): 14.
- [29] BENEDICT R, AMATO M P, DELUCA J, et al. Cognitive impairment in multiple sclerosis: Clinical management, MRI, and therapeutic avenues [J]. Lancet Neurol, 2020, 19(10): 860-871.
- [30] DELPECH J C, PATHAK D, VARGHESE M, et al. Wolframin-1-expressing neurons in the entorhinal cortex propagate tau to CA1 neurons and impair hippocampal memory in mice [J]. Sci Transl Med, 2021, 13(611): eabe8455.
- [31] 曹月盈, 孟祥宝, 孙桂波, 等. 二甲双胍联合小檗碱对db/db小鼠糖尿病认知功能障碍的改善作用[J]. 中国新药杂志, 2021, 30(8): 690-700.

[责任编辑 孙丛丛]