

远志-石菖蒲干预糖尿病 认知障碍大鼠血清甲基乙二醛的研究

黄小波, 陈文强*, 陈玉静, 王宁群, 刘妍
(首都医科大学宣武医院中医科, 北京 100053)

[摘要] 目的: 研究对药远志-石菖蒲对糖尿病大鼠学习记忆功能的干预情况。方法: 3 月龄雄性 Wistar 大鼠, 随机分为对照组、模型组、远志-石菖蒲干预组(高、中、低剂量组)。采取腹腔注射链脲佐菌素(Streptozotocin, STZ), 制备糖尿病大鼠模型。制备对药远志石菖蒲, 按成人用量的 20, 10, 5 倍的比例分成高、中、低 3 个剂量组。采用水迷宫实验和气相色谱-质谱联用仪(GC-MS), 分别观察糖尿病大鼠的行为学改变和血清甲基乙二醛(MG)变化。采用流式细胞技术, 观察糖尿病大鼠海马神经细胞凋亡发生率的变化。结果: Morris 水迷宫检测显示, 模型组大鼠到达站台时间较对照组明显延长($P < 0.05$), 远志石菖蒲各治疗组所需时间较模型组明显减少($P < 0.05$); GC-MS 测定糖尿病大鼠模型血清 MG 含量明显升高, 约为对照组的 2.5 倍, 远志-石菖蒲治疗组 MG 含量显著降低($P < 0.05$); 并减少大鼠海马神经细胞凋亡率($P < 0.05$)。结论: 远志石菖蒲能够通过降低大鼠血清 MG 水平, 改善糖尿病大鼠认知障碍。

[关键词] 远志; 石菖蒲; 糖尿病; 认知障碍; 甲基乙二醛

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0223-04

[doi] 10.11653/syfy2013240223

Research of Polygala tenuifolia and Rhizoma acori Tatarinowii in Improving Serum Methylglyoxal in Cognitive Impairment Diabetes Mellitus Rats

HUANG Xiao-bo, CHEN Wen-qiang*, CHEN Yu-jing, WANG Ning-qun, LIU Yan
(Department of Traditional Chinese Medicine, Xuanwu Hospital,
Capital Medical University, Beijing 100053, China)

[Abstract] **Objective:** To study the improvement of polygala tenuifolia and rhizoma acori tatarinowii in treating cognitive impairment of diabetes mellitus rats. **Method:** Diabetic rats were established by intraperitoneal injection of Streptozotocin for 3 months. The polygala tenuifolia and rhizoma acori tatarinowii decoction were made. The rats were divided into 5 groups: control group, model group, and polygala tenuifolia and rhizoma acori tatarinowii group (large dose group, medium dose group and small dose group). observed the change of rat's ability of learning and memory function observed were by the way of water maze and examination of the blood serum methylglyoxal through Gas Chromatography-Mass Spectrometry. The percentage of neuron apoptosis was examined through flow cytometry. **Result:** In the water maze experiment, it was shown that rats in model group needed more time to swim to the platform than the control group, and polygala tenuifolia and rhizoma acori tatarinowii could significantly reduce the swimming time to platform ($P < 0.01$). It was shown that the serum methylglyoxal of model group increased about 2.5 times more than the control group, and polygala tenuifolia and rhizoma acori tatarinowii

[收稿日期] 20130304(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81041022, 81102624);北京市自然科学基金项目(7102073);北京市科技新星项目(2008A090)

[第一作者] 黄小波, 硕士, 主任医师, 教授, 博士生导师, 从事中西医结合老年神经病学研究, Tel:010-83198374, Fax:010-83169017, E-mail: huangxiaobo@xwh.ccmu.edu.cn

[通讯作者] * 陈文强, 博士, 副主任医师, 从事中西医结合老年神经病学研究, Tel:010-83198327, E-mail: chenwenqiang@xwh.ccmu.edu.cn

could significantly reduce the serum methylglyoxal and the percentage of neuron apoptosis. **Conclusion:** Polygala tenuifolia and rhizoma acori tatarinowii could improve diabetes mellitus rat's cognitive impairment by reducing serum methylglyoxal.

[**Key words**] Polygala Tenuifolia; Rhizoma Acori Tatarinowii; diabetes mellitus; cognitive impairment; methylglyoxal

糖尿病患者存在某些方面的认知障碍,特别是其学习、记忆能力受损较为显著^[1]。而对于中老年人来说,轻微的认知功能减退即可显著增加发生老年痴呆的风险^[2]。甲基乙二醛(methylglyoxal, MG)蓄积是近年来发现的糖尿病重要的病理生理现象。MG 作为体内糖化、氧化反应的重要中间产物,具有较强的细胞毒性和生物活性,这类物质蓄积对糖尿病患者认知障碍发病的病理学意义日益受到重视和关注。因此,深入研究 MG 在糖尿病认知障碍发病中的具体作用机制具有重要的临床意义。

本研究应用以具有安神益智、开窍醒神功效的对药远志和石菖蒲对糖尿病认知障碍大鼠进行干预,观察糖尿病认知障碍大鼠的行为学、海马神经细胞凋亡和血清 MG 的变化,以研究中药治疗糖尿病认知障碍的作用机制。

1 材料

1.1 动物 3 月龄雄性 Wistar 大鼠 50 只,体重 180 ~ 200 g,由北京维通利华实验动物技术公司提供动物合格证号 [SCXK(京)2002-0003]。

1.2 药物 远志-石菖蒲(按照 1:1 配制),确定生药产地、炮制方法,委托我院中药制剂室进行加工,并对 pH、比重、卫生学等进行检测。按成人用量的 20,10,5 倍的比例分成高、中、低 3 个剂量组,以恒温水浴锅分别浓缩成含生药 2.0,1.0,0.5 g·mL⁻¹,消毒玻璃瓶密闭盛装,保存于 4 °C 冰箱备用,保存时间不超过 1 周,用前摇匀。

1.3 试剂和仪器 链脲佐菌素(Streptozotocin, STZ),MG 对照品和蛋白酶 K 均购自 Sigma 公司。One-Touch-II 快速血糖仪及血糖试纸购自强生公司;Morris 水迷宫及分析软件(中国医学科学院药物研究所)。气相色谱-质谱联用仪(Shimadzu QP2010 Plus),色谱柱(DB-5,0.25 μm × 0.25 mm × 30 m),电子天平(CP225D, Sartorius),氮吹仪(N-EAVPTM111, Organomation Associates, Inc.)。

2 方法

2.1 分组和给药 大鼠 50 只,使用随机数字表法分为 5 组。对照组:正常大鼠;模型组:糖尿病模型大鼠;远志石菖蒲干预组:糖尿病造模后第 2 天灌胃

中药,持续 30 d(分为高、中、低剂量 3 组);每周检测大鼠血糖 1 次。

2.2 制备糖尿病大鼠模型 大鼠造模前禁食不禁水 12 h,用 0.1 mol·L⁻¹新鲜配制的枸橼酸缓冲液(pH 4.4)配制 STZ 10 g·L⁻¹,按 60 mg·kg⁻¹剂量腹腔注射,非造模组注射相同体积的枸橼酸缓冲液。3 d 后用快速血糖仪测尾血,非禁食血糖 > 15 mmol·L⁻¹者为糖尿病模型成立。

2.3 Morris 水迷宫试验 由圆形水池和自动摄象及电脑分析系统组成。水池上方的摄像机同步记录大鼠的运动轨迹。水深 30 cm,水温控制在 22 ~ 25 °C。动物头朝池壁入水,120 s 未找到站台者,将其引至站台,放置 30 s 引导其学习与记忆,试验共进行 5 d,前 4 d 为训练时间,第 5 d 为测试。数据采集及图像分析均由图像自动监视和处理系统完成。实验结束后记录各动物的到达站台的游动时间及距离、初始角度、搜索站台的轨迹。

2.4 血清 MG 检测 远志-石菖蒲连续给药 30 d 后(期间每周检测 1 次血糖),大鼠经腹主动脉采血,3 000 r·min⁻¹离心,取上清冻存备用。移取 200 μL 血清于 1.5 mL 试管中,加入 5 μL 0.1% 十二烷基硫酸钠(SDS),10 μL 20 g·L⁻¹蛋白酶 K,200 μL 乙腈,充分混匀,15 000 r·min⁻¹离心后分离有机相,加入适量 HCl(pH 3),再加入 50 μL 25 g·L⁻¹乙醛对照品(PFBOA)衍生试剂,充分混匀,50 °C 下反应 2 h。加入 0.5 g NaCl,混匀,然后再加入 3 mL 乙醚/正己烷(1:1),充分混匀,离心除去有机相,置于一洁净试管中(管 A),加入 3 mL 乙酸乙酯进行第二次提取,同上步骤混匀离心。分离出有机相,置于管 A 中与第一次提取物混合,混合物随即冷却,进行 GC-MS 分析,记录色谱图。

2.5 血糖检测 日立 7170A 全自动生化分析仪检测大鼠血糖。

2.6 海马神经细胞凋亡检测 大鼠断头取脑后分离出海马,置于盛有 NS 的培养皿中,用两张经洁净处理的载玻片轻轻研磨组织匀浆,经 300 目筛网过滤获得单细胞悬液。用冰冷的 PBS 洗细胞 2 次,以 1 × Binding Buffer 重悬细胞至 1 × 10⁶/mL,取 100

μL 细胞悬液,加 Annexin-V-FITC 5 μL,PI 10 μL 混匀,室温下避光孵育 15 min,加入 400 μL 1 × Binding Buffer,进行流式细胞分析。激发波长 488 nm,计数 10⁴ 个细胞,所有资料经 Cell Qust 软件收集处理。

2.7 统计学处理 使用 SPSS 11.0 软件进行统计,数据使用 $\bar{x} \pm s$ 的方式表示,组间比较使用方差分析,组内比较使用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 作为有显著性差异。

3 结果

3.1 远志-石菖蒲对大鼠 Morris 水迷宫到达站台时间的影响 采用 Morris 水迷宫检测大鼠到达站台时间,结果显示,模型组所需时间较对照组明显延长 ($P < 0.01$),远志-石菖蒲各治疗组所需时间较模型组明显减少 ($P < 0.01$) (表 1)。

表 2 远志-石菖蒲对大鼠血清 MG 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·mL ⁻¹	治疗前血糖/mmol·L ⁻¹	治疗后血糖/mmol·L ⁻¹	MG 含量/μg·L ⁻¹
对照	-	8.69 ± 0.93	8.18 ± 0.79	85.49 ± 12.16
糖尿病模型	-	19.23 ± 2.57	19.20 ± 2.01	257.23 ± 12.90 ¹⁾
远志-石菖蒲	0.5	18.77 ± 1.99	17.86 ± 2.35	227.34 ± 19.15
	1.0	18.92 ± 1.69	18.29 ± 2.18	176.23 ± 18.07 ³⁾
	2.0	19.26 ± 2.25	17.33 ± 2.69	166.58 ± 17.29 ³⁾

3.3 远志-石菖蒲对大鼠海马神经细胞凋亡的影响 采用 Annexin-V-FITC & PI 双染流式细胞技术检测大鼠海马神经细胞凋亡情况,结果显示模型组细胞凋亡率较对照组明显增多 ($P < 0.01$),远志-石菖蒲各治疗组细胞凋亡率较模型组明显减少 ($P < 0.01$) (表 1)。

3.4 血清 MG 与海马神经细胞凋亡率的相关分析 对远志-石菖蒲大剂量组每只动物血清 MG 的含量与神经细胞凋亡率进行相关性分析,结果表明,大鼠血清 MG 与海马神经细胞凋亡率呈显著正相关 ($r = 0.707, P = 0.022$) (图 1)。

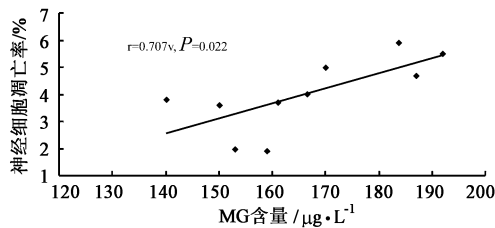


图 1 大鼠血清 MG 与海马神经细胞凋亡率的相关性

4 讨论

糖尿病高血糖导致 MG 在体内蓄积,一方面可以通过生成晚期糖基化终产物而导致海马神经元的凋亡或退化^[3-4];另一方面 MG 自身具有较强的细胞毒性,可以直接作用于海马神经元,而发生病理生物

表 1 远志-石菖蒲对大鼠 Morris 水迷宫到达站台时间及对大鼠海马神经细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·mL ⁻¹	时间 /s	神经细胞凋亡率 /%
正常对照	-	7.9 ± 3.6	3.55 ± 1.27
糖尿病模型	-	20.1 ± 5.7 ¹⁾	10.59 ± 2.18 ¹⁾
远志-石菖蒲	0.5	10.9 ± 3.6 ³⁾	7.20 ± 1.76 ²⁾
	1.0	10.7 ± 3.1 ³⁾	4.18 ± 1.70 ³⁾
	2.0	8.6 ± 4.1 ³⁾	4.01 ± 1.52 ³⁾

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 远志-石菖蒲对大鼠血清 MG 的影响 结果显示,治疗前后各组动物血糖无显著差异;糖尿病大鼠模型血清中 MG 含量明显升高,约为对照组的 2.5 倍;远志-石菖蒲治疗组 MG 含量显著降低 ($P < 0.01$) (表 2)。

学作用^[5],因而在糖尿病认知障碍发病过程中具有重要意义。

对药作为处方配伍中相对固定的成对出现的药物,是中药复方配伍的最简单、最基本的形式,既具有复方的特性,又具有单味中药成分相对简单便于研究的特点,体现着中药方剂适证化裁,灵活加减的运用特点。

本研究中使用远志、石菖蒲对糖尿病大鼠进行干预,在 Morris 试验中发现远志、石菖蒲能够显著缩短大鼠到达站台的时间。这表明,糖尿病大鼠存在一定程度的认知障碍,而远志、石菖蒲能够改善糖尿病大鼠的认知障碍。对大鼠血清 MG 进行检测,则发现糖尿病大鼠血清 MG 水平显著升高。这可能是因为糖尿病时,血糖水平升高促进 Maillard 反应和多元醇途径生成 MG^[6];同时乙二醛酶活性下降则导致乙二醛酶 I 对 MG 的代谢功能减退^[7];另外,糖尿病时机体处于氧化应激状态,体内高水平的活性氧中间产物可能刺激细胞产生 MG^[8],最终导致糖尿病患者血清中 MG 生成显著增加^[9]。而远志、石菖蒲则能够有效降低血清 MG 水平,进而减轻 MG 在体内的神经毒性,降低海马神经细胞的凋亡,也可能是其能够改善糖尿病大鼠认知功能障碍的原因之一。

3种重金属对欧洲花楸悬浮细胞生物量的影响

黄蕾, 肖文娟, 刘超, 杨光, 郝庆秀, 吴志刚, 郭兰萍*

(中国中医科学院中药资源中心, 北京 100700)

[摘要] 目的:以欧洲花楸悬浮培养细胞(SASC)为材料,研究非生物诱导子-重金属对SASC生物量的影响。方法:配制不同浓度的氯化镉、硝酸铜、硝酸铅溶液对SASC进行处理,用电子天平进行SASC生物量测定。结果:低浓度氯化镉刺激细胞生长而高浓度则抑制细胞生长,对细胞生长的影响表现为Hormesis现象,最适刺激质量浓度为 $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$;低浓度硝酸铜抑制细胞生长,高浓度刺激细胞生长, $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 硝酸铜处理后细胞生物量最低;基本所有浓度的硝酸铅都表现为刺激细胞生长,最适刺激质量浓度为 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。结论:重金属诱导子影响了SASC的生物量,且其作用程度和方式与氯化镉、硝酸铜、硝酸铅3种诱导子种类及浓度相关。

[关键词] 重金属(镉 铜 铅); 欧洲花楸; 生物量

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0226-04

[doi] 10.11653/syjf2013240226

Effect of Three Heavy Metals on Cell Suspension Cultures of *Sorbus aucuparia* Biomass

HUANG Lei, XIAO Wen-juan, LIU Chao, YANG Guang, HAO Qing-xiu, WU Zhi-gang, GUO Lan-ping*

[收稿日期] 20130705(022)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81130070, 81072989);国家科技支撑计划项目(2012BAI29B02);国家中医药管理局行业科研专项(201107009)

[第一作者] 黄蕾,硕士生, Tel:010-64014411, E-mail:hnlei-27@163.com

[通讯作者] *郭兰萍,博士,研究员,从事中药资源与鉴定研究, Tel:010-64011944, E-mail:glp01@126.com

[参考文献]

- [1] Debling D, Amelang M, Hasselbach P, et al. Diabetes and cognitive function in a population-based study of elderly women and men[J]. J Diabetes Complications, 2006, 20(4): 238.
- [2] Fischer P, Jungwirth S, Zehetmayer S, et al. Conversion from subtypes of mild cognitive impairment to Alzheimer dementia [J]. Neurology, 2007, 68(4): 288.
- [3] Sima A A, Kamiya H, Li Z G. Insulin, C-peptide, hyperglycemia, and central nervous system complications in diabetes[J]. Eur J Pharmacol, 2004, 490(1/3): 187.
- [4] Sato T, Shimogaito N, Wu X, et al. Toxic advanced glycation end products (TAGE) theory in Alzheimer's disease[J]. Am J Alzheimers Dis Other Demen, 2006, 21(3): 197.
- [5] Di Loreto S, Caracciolo V, Colafarina S, et al. Methylglyoxal induces oxidative stress-dependent cell injury and up-regulation of interleukin-1beta and nerve growth factor in cultured hippocampal neuronal cells [J]. Brain Res, 2004, 1006(2): 157.
- [6] Thornalley P J, Anngborg A, Minhas H S. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose[J]. Biochem J, 1999, 344(1): 109.
- [7] Miller A G, Smith D G, Bhat M, et al. Glyoxalase I is critical for human retinal capillary pericyte survival under hyperglycemic conditions [J]. J Biol Chem, 2006, 281(17): 11864.
- [8] Beisswenger P J, Drummond K S, Nelson R G, et al. Susceptibility to diabetic nephropathy is related to dicarbonyl and oxidative stress[J]. Diabetes, 2005, 54(11): 3274.
- [9] Odani H, Shinzato T, Matsumoto Y, et al. Increase in three alpha,beta-dicarbonyl compound levels in human uremic plasma: specific *in vivo* determination of intermediates in advanced Maillard reaction [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 256(1): 89.

[责任编辑 邹晓翠]