

DOI:CNKI;11-3495/R. 20110321. 1137. 014

· 药理 ·

脑康Ⅱ号干预糖尿病认知障碍大鼠血清 3-脱氧葡萄糖醛酮的研究

黄小波, 陈文强*, 王宁群, 陈玉静

(首都医科大学宣武医院中医科, 北京 100053)

[摘要] 目的:研究脑康Ⅱ号对糖尿病大鼠学习记忆功能的干预情况。方法:将 3 月龄雄性 Wistar 大鼠分为对照组、模型组、脑康Ⅱ号干预组(分为高、中、低剂量 3 组),模型组和脑康Ⅱ号干预组用链脲佐菌素 $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量 ip,对照组 ip 相同体积的枸橼酸缓冲液,脑康Ⅱ号干预组分别使用 20, 10, 5 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的脑康Ⅱ号 ig,采用水迷宫实验和气相色谱-质谱联用仪,分别观察糖尿病大鼠的行为学改变和血清 3-脱氧葡萄糖醛酮(3-DG)的变化。结果:造模后模型组和中药干预组大鼠血糖较对照组显著升高($P < 0.01$)。Morris 水迷宫检测大鼠到达站台时间显示,模型组需 $(18.6 \pm 6.3) \text{ s}$ 时间较对照组 $(7.5 \pm 3.1) \text{ s}$ 明显延长,具有显著性差异($P < 0.01$)。脑康Ⅱ号各治疗组所需时间(低、中、高剂量组分别为 $(9.9 \pm 3.2) \text{ s}$, $(8.7 \pm 4.1) \text{ s}$, $(10.1 \pm 3.9) \text{ s}$,较模型组明显减少($P < 0.01$)。糖尿病大鼠模型血清中 3-DG 含量 $(20.19 \pm 2.62) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,较对照组显著升高($P < 0.05$),约为对照组 $(7.02 \pm 1.19) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 2.5 倍。脑康Ⅱ号高剂量治疗组 3-DG 含量较模型组显著降低 $(8.89 \pm 1.09) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($P < 0.05$)。结论:脑康Ⅱ号能够通过降低大鼠血清 3-脱氧葡萄糖醛酮的水平,改善糖尿病大鼠认知障碍。

[关键词] 脑康Ⅱ号;糖尿病;认知障碍;3-脱氧葡萄糖醛酮

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)10-0119-03

Intervention of Serum 3-deoxyglucosone by Naokang II in Rats with Diabetes Mellitus and Cognitive Impairment

HUANG Xiao-bo, CHEN Wen-qiang*, WANG Ning-qun, CHEN Yu-jing

(Department of Traditional Chinese Medicine, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China)

[Abstract] **Objective:** To study the influence of Naokang II on diabetes mellitus and cognitive impairment in rats. **Method:** We used Naokang II to treat rats with diabetes mellitus and cognitive impairment. We observed the change of rat's ability of learning and memory function, by the application of water maze, and examined the blood serum 3-deoxyglucosone using gas chromatography-mass spectrometry. **Result:** Naokang II could not reduce rats serum glucose, but it could significantly reduce the swimming time to platform and serum 3-deoxyglucosone. **Conclusion:** Naokang II could improve diabetes mellitus rat's cognitive impairment, by reducing serum 3-deoxyglucosone.

[Key words] Naokang II; diabetes mellitus; cognitive impairment; 3-deoxyglucosone

[收稿日期] 20101104(009)

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

[第一作者] 黄小波, 硕士, 主任医师, 研究方向: 中西医结合老年神经病学, Tel: 010-83198327, E-mail: huangxiaobo@bjgn.org

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

[网络出版时间] 2011-03-21 11:37

随着人口老龄化进程的加快,糖尿病已成为全球面临的严重社会问题。糖尿病糖代谢紊乱可以在结构、神经生理、神经精神等诸多方面对大脑产生不良影响。研究表明,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^[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危险^[2]。3-脱氧葡萄糖醛酮(3-deoxyglucosone, 3-DG)蓄积是近年发现的糖尿病重要的病理生理现象。3-DG 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认知障碍发病的病理学意义日益受到重视和关注^[3]。因此,深入研究 3-DG 在糖尿病认知障碍发病中的具体生物作用机制具有重要的临床意义。本研究应用以补髓益智、活血化瘀立法的中药脑康 II 号对糖尿病认知障碍大鼠进行干预,观察大鼠的行为学和血清 3-DG 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,体重 180 ~ 200 g,由北京维通利华实验动物技术公司提供,SPF 级,SCXK(京)2002-0003。

1.2 药物 制何首乌,熟地黄,三七,菖蒲,参照《中国药典》(2000 年版),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(批号 S0130),3-DG 对照品(批号 75762)和蛋白酶 K(批号 p2308)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-5,30 m × 0.25 mm × 0.25 μm);电子天平(CP225D,Sartorius);氮吹仪(N-EAVPTM111,Organomation Associates,Inc.)。

2 方法

2.1 分组和给药 使用随机数字表法分组。对照组:正常大鼠;模型组:糖尿病模型大鼠;脑康 II 号干预组:糖尿病造模后第 2 天 ig 中药,持续 30 d(分为高、中、低剂量组,分别为生药 20,10,5 g·kg⁻¹);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)配制链脲佐菌素(streptozotocin, STZ) 10 g·L⁻¹,按 60 mg·kg⁻¹剂量 ip,非造模组 ip 相同体积的枸橼酸缓冲液。3 d 后用快速血糖仪测尾血,随机血糖 > 16.7 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 之间。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 天为测试。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 3-DG 检测 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乙醛标准品(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 2 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 统计学处理 使用 SPSS 11.0 软件进行分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较使用单因素方差分析, $P < 0.05$ 作为有显著性差异。

3 结果

3.1 脑康 II 号对大鼠血糖的影响 检测大鼠血清葡萄糖发现,造模后模型组和中药干预组大鼠血糖较对照组显著升高($P < 0.01$)。中药干预各组与模型组大鼠血糖水平在实验期间未发生显著变化,各组之间无显著性差异,见表 1。

3.2 脑康 II 号对大鼠 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,模型组需(18.6 ± 6.3)s 时间,较对照组(7.5 ± 3.1)s 明显延长,具有显著性差异($P <$

表1 脑康Ⅱ号对大鼠血糖和血清3-DG的影响($\bar{x} \pm s$)

分组	剂量 /g·kg ⁻¹	n	血糖/mmol·L ⁻¹					3-DG /μg·L ⁻¹
			第1周	第2周	第3周	第4周	第5周	
正常对照	-	10	8.93 ± 0.86	7.12 ± 0.93	8.11 ± 1.21	7.67 ± 0.95	8.05 ± 0.83	7.02 ± 1.19
模型	-	10	20.15 ± 2.32 ²⁾	23.57 ± 2.13 ²⁾	22.93 ± 2.62 ²⁾	22.29 ± 3.08 ²⁾	18.20 ± 1.71 ²⁾	20.19 ± 2.62 ²⁾
脑康Ⅱ号	5	9	18.59 ± 1.96 ²⁾	22.53 ± 2.81 ²⁾	21.15 ± 2.66 ²⁾	21.04 ± 1.97 ²⁾	17.74 ± 2.18 ²⁾	17.65 ± 2.68
	10	9	19.12 ± 2.74 ²⁾	20.11 ± 1.85 ²⁾	19.53 ± 2.03 ²⁾	19.98 ± 2.55 ²⁾	18.47 ± 1.52 ²⁾	13.27 ± 1.81
	20	9	18.22 ± 2.56 ²⁾	21.39 ± 2.29 ²⁾	18.61 ± 1.78 ²⁾	19.37 ± 2.11 ²⁾	17.23 ± 3.10 ²⁾	8.89 ± 1.09 ³⁾

注:与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

0.01);脑康Ⅱ号各治疗组所需时间:小剂量组(9.9 ± 3.2)s;中剂量组(8.7 ± 4.1)s;大剂量组(10.1 ± 3.9)s较模型组明显减少,均具有显著性差异($P < 0.01$)。对照组与脑康Ⅱ号治疗组大鼠到达站台时间无显著性差异。

3.3 脑康Ⅱ号对大鼠血清3-DG的影响 检测大鼠血清3-DG水平显示,与对照组比较,糖尿病大鼠模型血清中3-DG含量显著升高($P < 0.01$),约为对照组的2.5倍。脑康Ⅱ号大剂量治疗组3-DG含量则较模型组显著降低($P < 0.01$),见表1。

4 讨论

糖尿病认知障碍的发病机制目前还没有完全明确,但已发现与大脑缺血,氧化应激、非酶糖基化、胰岛素的副作用及钙离子稳态的改变等有关^[4]。糖尿病高血糖导致3-DG在体内蓄积,可以通过生成晚期糖基化终产物而导致海马神经元退化或凋亡^[5],因而在糖尿病认知障碍发病过程中具有重要的意义。

作者认为糖尿病认知障碍以精髓亏虚,痰瘀互阻为基本病机^[6]。基于此,作者以补髓益智、活血化瘀为法,研制了“脑康Ⅱ号”,方中制首乌、熟地黄补髓益智,三七活血化瘀,菖蒲开窍化痰,用于干预糖尿病因肾精亏损,髓失养,痰瘀互阻而致的认知障碍。

用脑康Ⅱ号对糖尿病大鼠进行干预,在Morris试验中发现脑康Ⅱ号能够显著缩短大鼠到达站台时间。这表明糖尿病大鼠存在一定程度的认知障碍,而脑康Ⅱ号能够改善糖尿病大鼠的认知障碍。对大鼠血清3-DG检测,则发现糖尿病大鼠血清3-DG含量显著升高。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3-DG^[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3-DG^[8],最终导

致糖尿病血清中3-DG生成显著增加。而脑康Ⅱ号则能够在不显著降低大鼠血糖的情况下,即改善大鼠的认知功能,可能与其能有效降低血清3-DG水平,进而减轻3-DG在体内的神经毒性有关。

[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] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 黄小波,李宗信,陈文强,等. 2型糖尿病认知障碍的中医证候聚类分型[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2009, 16(1):11.
- [7] 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.
- [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.

[责任编辑 聂淑琴]