

# 交泰丸对糖尿病小鼠认知功能障碍的影响及机制

李娟娥\*, 姜小帆

(陕西省人民医院, 西安交通大学第三附属医院, 西安 710068)

**[摘要]** 目的:观察交泰丸(Jiaotaiwan, JTW)不同配伍比例对糖尿病胰岛素抵抗、认知功能障碍的作用,并探讨其机制。方法:自发性糖尿病 db/db 小鼠 40 只,随机分为模型组,交泰丸 1 号组(1.68 g·kg<sup>-1</sup>),交泰丸 2 号组(3.36 g·kg<sup>-1</sup>),交泰丸 3 号组(8.40 g·kg<sup>-1</sup>),每组 8 只,另设同周龄 C57BL/6J 小鼠 8 只为正常组。干预 8 周后,检测小鼠学习记忆,空间探索能力;检测空腹血糖(fasting blood glucose, FBG),胰岛素水平(fasting insulin, Fins),计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR),总甘油三酯(total triglyceride, TG),总胆固醇(total cholesterol, TC),游离脂肪酸(free fatty acids, FFA),高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL),低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)等;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 tau 蛋白 pSer199, pSer202, pSer214 位点,磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt),糖原合酶激酶-3β(glycogen synthase kinase-3β, GSK-3β),磷酸化 GSK-3β(p-GSK-3β)蛋白表达。结果:与模型组比较,交泰丸 2,3 号组 FBG, Fins 和 HOMA-IR 显著降低( $P < 0.01$ );TG, TC, HDL, FFA 显著降低( $P < 0.01$ );分辨指数、穿越平台次数显著提高( $P < 0.01$ );小鼠海马 tau 蛋白 pSer199, pSer202, pSer214 位点, GSK-3β 蛋白表达明显降低( $P < 0.05, P < 0.01$ ), p-Akt, p-GSK-3β 表达显著升高( $P < 0.01$ )。结论:交泰丸 3 号(黄连-肉桂 10:1)具有改善胰岛素抵抗及认知功能障碍的作用,可能与其抑制 tau 蛋白过度磷酸化,下调 GSK-3β 蛋白表达和上调 p-Akt, p-GSK-3β 表达有关。

**[关键词]** 交泰丸; 2 型糖尿病; 认知功能障碍; tau 蛋白; 糖原合成激酶 3β

**[中图分类号]** R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)17-0023-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20190921

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190116.1822.010.html>

**[网络出版时间]** 2019-01-17 16:10

## Effect and Mechanism of Jiaotaiwan on Cognitive Impairment in Diabetic Mice

LI Juan-e\*, JIANG Xiao-fan

(Shaanxi Provincial People's Hospital, Third Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710068, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore effect and mechanism of Jiaotaiwan (JTW) on cognitive impairment in diabetic mice. **Method:** The 40 db/db mice of spontaneous diabetes were randomly divided into model group, JTW 1 group (1.68 g·kg<sup>-1</sup>), JTW 2 group (3.36 g·kg<sup>-1</sup>), and JTW 3 group (8.40 g·kg<sup>-1</sup>), with 8 mice in each group, and 8 C57BL/6J mice were included into normal group. After 8 weeks of treatment, behavioral test, fasting blood glucose (FBG), fasting insulin (Fins), insulin resistance index (HOMA-IR), total triglyceride (TG), total cholesterol (TC), free fatty acids (FFA), high density lipoprotein (HDL), and low density lipoprotein (LDL) were detected. Western blot was used to detect protein expressions of pSer199, pSer202, pSer214, p-Akt, glycogen synthase kinase-3β (GSK-3β), phospho-GSK-3β (p-GSK-3β). **Result:** Compared with model group, FBG, Fins, HOMA-IR, TG, TC, HDL, FFA in JTW group decreased significantly ( $P < 0.01$ ), with a significant improvement in cognitive function ( $P < 0.01$ ), protein expressions of taupSer199, pSer202, pSer214 and GSK-3β in hippocampus of mice decreased significantly ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), and expressions of p-Akt and p-GSK3 beta significantly increased ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** JTW 3 (Coptidis

**[收稿日期]** 20181011(005)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81503538);陕西省自然科学基金研究计划项目(2018JQ8057)

**[通信作者]** \*李娟娥,博士,从事中医药防治糖尿病及并发症的临床及作用机制研究, E-mail: lizhuan\_1980@126.com

Rhizoma-Cinnamomi Cortex 10:1) can alleviate insulin resistance and cognitive impairment. The mechanism may be related to the inhibition of over-phosphorylation of tau protein, the down-regulation of GSK-3 $\beta$  protein expression and the up-regulation of p-Akt and p-GSK-3 $\beta$  expressions.

**[Key words]** Jiaotaiwan; type 2 diabetes; cognitive impairment; tau protein; glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ )

近年来,随着糖尿病(DM)患病率不断增高,DM对中枢神经系统的影响受到了国内外学者的广泛关注。其中,老年糖尿病患者并发阿尔茨海默病(AD)的现象非常普遍<sup>[1]</sup>,AD的早期表现以轻度认知功能障碍(MCI)为主<sup>[2]</sup>,已经报道DM对认知功能有一定的影响<sup>[3]</sup>,但至今相关环节及机制不甚明了。目前,研究认为AD主要与海马细胞外 $\beta$ -淀粉样蛋白(A $\beta$ )沉积形成的老年斑(SP),细胞内tau蛋白过度磷酸化导致的神经纤维缠结(NFTs)等病理变化相关,tau蛋白过度磷酸化受胰岛素及胰岛素样生长因子-1(IGF-1)信号转导通路下游糖原合酶激酶-3 $\beta$ (GSK-3 $\beta$ )调节<sup>[4]</sup>。另有研究发现,AD患者脑中前额皮层、内嗅区皮层的GSK-3 $\beta$ 过度表达<sup>[5]</sup>。因此,这为研究防治DM相关AD提供了新途径。

《韩氏医通》记载的交泰丸(JTW)由黄连片、肉桂组成,配伍精当,用于治疗“心肾不交”的失眠、健忘、怔忡等<sup>[6]</sup>。现代药理及临床研究表明,交泰丸能够显著改善糖脂代谢,增加骨骼肌胰岛素信号通路中胰岛素受体底物-1(IRS-1),葡萄糖转运体4(GLUT4)等蛋白的表达<sup>[7-8]</sup>;作用于大鼠海马区神经元抗血管性痴呆<sup>[9]</sup>;以及镇静催眠抗抑郁的作用<sup>[10]</sup>。本研究旨在利用自发性2型DM db/db小鼠为模型,探讨交泰丸防治DM相关MCI/AD的机制。

## 1 材料

**1.1 药物准备** 交泰丸由黄连片、肉桂<sup>[6]</sup>组成,药材购于北京市双桥燕京中药饮片厂(批号201611),经陕西省人民医院李巧茹主任药师鉴定,分别为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* 的干燥根茎和樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* 的干燥树皮。交泰丸1号方(黄连-肉桂2:1,JWTW1),取黄连片90g,肉桂45g,加10倍体积水煎煮2次,第1次约2h,第2次1h,煎煮过程用挥发油提取器提取挥发油,浓缩水煎液至100mL,合并挥发油0.23mL(收率0.17%)。交泰丸2号方(黄连-肉桂4:1,JWTW2),取黄连片180g,肉桂45g,同上法提取,合并挥发油0.13mL(收率0.06%)。交泰丸3号方(黄连-肉桂10:1,JWTW3),取黄连片450g,肉桂45g,同上法提

取,合并挥发油0.08mL(收率0.02%)。

**1.2 试剂** 空腹血糖(FBG),甘油三酯(TG),总胆固醇(TC),低密度脂蛋白(LDL),高密度脂蛋白(HDL)试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司,批号分别为YZB/京0111-2013,146961, YZB/京0698-2010, YZB/京06997-2010, YZB/国2080-2003);游离脂肪酸(FFA),胰岛素(Fins)试剂盒(北京华英生物技术研究所,批号分别为HY-N0057, 20162400316);RIPA裂解缓冲液(北京普利莱基因技术有限公司,批号C1053);tau-pSer199, pSer202, pSer214, p-Akt, GSK3 $\beta$ , 磷酸化GSK-3 $\beta$  (p-GSK-3 $\beta$ ) Rabbit mAb,  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体,羊抗兔II抗(CST公司,批号分别为29957, 39357, 77348, 13038, 5676, 8466, 4970, 14708);ECL发光液(Bio-Rad公司,批号170-5060)。

**1.3 仪器** 7160型全自动生化仪(日本日立公司);r-911型全自动放免计数仪(中国科技大学实业总公司);E9032型酶标仪(美国Promega公司);ChemiDoc™ XRS + with Image Lab™ Software垂直电泳仪、转移槽、数码凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组与给药** 6~7周龄SPF级雄性db/db肥胖小鼠[BKS. Cg-m +/+ Leprdb/J]40只,体质量(42.64 ± 1.13)g,空白组为同周龄同性别野生型db/+小鼠[BKS. Cg-m (+/+)/J]8只,体质量(18.29 ± 0.42)g,均购自南京大学模式动物研究所,合格证号SCXK(苏)2010-0001。适应性喂养1周,断尾取血检测血糖,将血糖 > 16.7 mmol·L<sup>-1</sup>的db/db小鼠按血糖值采用随机数字表法随机分为模型组,交泰丸1号(黄连-肉桂2:1),交泰丸2号(黄连-肉桂4:1),交泰丸3号(黄连-肉桂10:1),每组8只。给药量按体表面积法换算<sup>[11]</sup>各组给药量相当生药量3.36 g·kg<sup>-1</sup>;第2周开始给药,空白组及模型组予等体积的生理盐水,均为灌胃给药,1次/日,给药8周。

**2.2 标本采集** 末次给药后禁食不禁水12h,随机选取小鼠断尾取血检测FBG,并按10mL·kg<sup>-1</sup>体质量腹腔注射1%戊巴比妥钠麻醉,眼眶取血,分离血

清, -20 °C 冷藏备用。迅速冰台断头, 快速取出海马组织, 放于冻存管内, 速置液氮中, 然后转移到 -80 °C 保存。

### 2.3 检测指标及方法

**2.3.1 血液生化指标检测** 眼眶取血, 15 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min 获得血清。全自动放免计数仪检测血清 Fins, TG, TC, FFA, HDL, LDL, 计算胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR) = FBG × 血清胰岛素水平/22.5。

**2.3.2 行为学检测** 新物体识别实验, 参考文献 [12] 进行, 首先在黑色盒子中进行训练环节, 在盒子一侧壁左右两端分别放置两个相同物体, 小鼠自由探索 10 min 后, 将小鼠取出。休息 1 h 后进行测试环节, 场地内一个旧物体被换作另一个大小相同但形状不同的新物体, 然后待测小鼠放入盒子测试 2 min, 记录小鼠与新旧物体接触次数。与新物体接触次数记为 T<sub>N</sub>, 与旧物体接触次数记为 T<sub>F</sub>, 并据此计算新物体识别指数, 即 T<sub>N</sub>/(T<sub>F</sub> + T<sub>N</sub>)。

水迷宫实验<sup>[13]</sup>, 水迷宫为一圆形水桶, 直径约 100 cm, 高 40 cm, 水深 30 cm, 在水池上方安置摄像头, 连接水迷宫图像自动采集和处理系统。首先进行隐匿平台实验, 从 4 个象限入水点将小鼠面向池壁放入水中, 观察并记录小鼠找到并爬上隐蔽平台时间, 60 s 内找到并爬上隐蔽平台后, 让其在平台停留 10 s。如果 60 s 内没找到平台, 则引导其爬上隐蔽平台, 并在平台上停留 10 s, 此时潜伏期记录为 60 s。训练结束后, 将小鼠置于笼中, 并注意保暖、用吹风机烘干鼠毛。每天在 4 个人水点各训练 1 次。其次, 隐匿平台实验结束 24 h 后, 撤走水下圆形平台, 任选 1 个人水点将小鼠面向池壁放入水中, 记录小鼠在 60 s 内穿越原平台所在位置次数, 记录并进行统计处理。

**2.3.3 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测相关蛋白表达** 取一定量冻存小鼠海马组织, 含 PMSF 的

RIPA 裂解液提取总蛋白制备样品; BCA 法检测蛋白浓度; 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白; 半干转法转膜 (100 A, 2 h), 5% 脱脂奶粉室温封闭; 孵育 I 抗 (1:1 000) 4 °C 过夜; 洗膜后 II 抗 (1:1 万) 室温孵育 1 h; ECL 发光液反应, 凝胶成像系统成像显影; Lab Works 软件分析图像灰度值, 目的蛋白/内参蛋白来表示各组蛋白表达。

**2.3.4 统计学方法** 采用 SPSS 19.0 软件处理数据, 用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较满足方差齐性时用单因素方差分析方法; 不满足方差齐性时用非参数检验;  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 交泰丸对 db/db 小鼠空腹血糖及胰岛素抵抗的影响** 与正常组比较, 模型组小鼠 FBG, Fins, HOMA-IR 显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 交泰丸 2, 3 号组小鼠 FBG, Fins, HOMA-IR 明显降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 交泰丸 3 号效果更为显著。见表 1。

表 1 交泰丸对小鼠空腹血糖、胰岛素抵抗的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )  
Table 1 Effect of Jiaotaiwan (JTW) on FBG, IR in mice ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

| 组别      | 剂量 /g·kg <sup>-1</sup> | FBG /mmol·L <sup>-1</sup>  | Fins /mU·L <sup>-1</sup>   | HOMA-IR                    |
|---------|------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 正常      | -                      | 5.23 ± 0.87                | 13.36 ± 1.36               | 3.01 ± 0.60                |
| 模型      | -                      | 23.09 ± 4.54 <sup>2)</sup> | 20.58 ± 3.01 <sup>2)</sup> | 20.42 ± 1.34 <sup>2)</sup> |
| 交泰丸 1 号 | 3.36                   | 16.95 ± 2.17 <sup>3)</sup> | 20.66 ± 1.81               | 15.05 ± 1.56               |
| 交泰丸 2 号 | 3.36                   | 14.74 ± 4.64 <sup>4)</sup> | 17.51 ± 2.23 <sup>3)</sup> | 11.34 ± 1.01 <sup>4)</sup> |
| 交泰丸 3 号 | 3.36                   | 11.21 ± 2.51 <sup>4)</sup> | 16.32 ± 2.86 <sup>4)</sup> | 8.43 ± 1.67 <sup>4)</sup>  |

注: 与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$  (表 2 ~ 5 同)。

**3.2 交泰丸对 db/db 小鼠血脂的影响** 与正常组比较, 模型组小鼠 TG, TC, LDL-C, FFA 显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 交泰丸 3 号组小鼠 TG, TC, FFA 显著降低 ( $P < 0.01$ ), HDL 显著升高 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

表 2 交泰丸对小鼠血脂的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

| 组别      | 剂量/g·kg <sup>-1</sup> | TG                        | TC                        | LDL                       | HDL                       | FFA                       |
|---------|-----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 正常      | -                     | 0.33 ± 0.02               | 2.20 ± 0.11               | 0.72 ± 0.18               | 0.59 ± 0.13               | 0.40 ± 0.05               |
| 模型      | -                     | 0.46 ± 0.11 <sup>2)</sup> | 3.41 ± 0.31 <sup>2)</sup> | 2.21 ± 0.34 <sup>2)</sup> | 1.14 ± 0.04 <sup>2)</sup> | 0.60 ± 0.11 <sup>2)</sup> |
| 交泰丸 1 号 | 3.36                  | 0.36 ± 0.08               | 3.13 ± 0.60               | 2.26 ± 0.37               | 1.48 ± 0.18 <sup>4)</sup> | 0.47 ± 0.16               |
| 交泰丸 2 号 | 3.36                  | 0.33 ± 0.04 <sup>4)</sup> | 3.03 ± 0.61               | 2.27 ± 0.37               | 1.09 ± 0.21               | 0.32 ± 0.04 <sup>4)</sup> |
| 交泰丸 3 号 | 3.36                  | 0.31 ± 0.06 <sup>4)</sup> | 2.87 ± 0.36 <sup>4)</sup> | 1.97 ± 0.18               | 1.53 ± 0.25 <sup>4)</sup> | 0.42 ± 0.07 <sup>4)</sup> |

**3.3 交泰丸对 db/db 小鼠行为学的影响** 与正常组小鼠比较, 模型组小鼠分辨指数、穿越平台次数显

著减低 ( $P < 0.01$ ), 说明模型组小鼠的记忆能力、探索能力与正常组小鼠相比受到损害; 与模型组比较,

交泰丸 2,3 号能显著提高分辨指数、穿越平台次数 ( $P < 0.01$ ), 说明交泰丸能够提高 db/db 小鼠的学习记忆能力、空间探索能力。见表 3。

表 3 交泰丸对小鼠新物体识别实验、空间探索实验影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )  
Table 3 Effect of JTW on test of new object recognition, space exploration in mice ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

| 组别      | 剂量/ $g \cdot kg^{-1}$ | 分辨指数                      | 穿越平台次数/次                  |
|---------|-----------------------|---------------------------|---------------------------|
| 正常      | -                     | 0.30 ± 0.02               | 5.88 ± 1.64               |
| 模型      | -                     | 0.20 ± 0.02 <sup>2)</sup> | 2.13 ± 0.99 <sup>2)</sup> |
| 交泰丸 1 号 | 3.36                  | 0.25 ± 0.02 <sup>4)</sup> | 3.13 ± 0.35 <sup>3)</sup> |
| 交泰丸 2 号 | 3.36                  | 0.27 ± 0.02 <sup>4)</sup> | 4.25 ± 0.71 <sup>4)</sup> |
| 交泰丸 3 号 | 3.36                  | 0.31 ± 0.03 <sup>4)</sup> | 5.75 ± 1.04 <sup>4)</sup> |

3.4 交泰丸对 db/db 小鼠海马组织 tau 蛋白过度磷酸化的影响 与正常组比较, 模型组小鼠 tau 蛋白 pSer199, pSer202, pSer214 位点表达显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 交泰丸 3 号组小鼠 tau 蛋白 pSer199, pSer202, pSer214 位点表达显著降低 ( $P < 0.01$ ), 说明交泰丸能改善小鼠海马 tau 蛋白过度磷酸化。见表 4, 图 1。

表 4 交泰丸对小鼠海马 tau 蛋白 pSer199, pSer202, pSer214 位点表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 4 Effect of JTW on protein expressions of pSer199, pSer202, pSer214 in hippocampus ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

| 组别      | 剂量/ $g \cdot kg^{-1}$ | pSer199/ $\beta$ -actin   | pSer202/ $\beta$ -actin   | pSer214/ $\beta$ -actin   |
|---------|-----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 正常      | -                     | 0.24 ± 0.01               | 0.13 ± 0.02               | 0.22 ± 0.01               |
| 模型      | -                     | 1.15 ± 0.03 <sup>2)</sup> | 0.98 ± 0.01 <sup>2)</sup> | 1.04 ± 0.02 <sup>2)</sup> |
| 交泰丸 1 号 | 3.36                  | 0.93 ± 0.07               | 0.81 ± 0.04               | 0.86 ± 0.04               |
| 交泰丸 2 号 | 3.36                  | 0.72 ± 0.06 <sup>3)</sup> | 0.77 ± 0.03               | 0.64 ± 0.02 <sup>3)</sup> |
| 交泰丸 3 号 | 3.36                  | 0.29 ± 0.02 <sup>4)</sup> | 0.20 ± 0.01 <sup>4)</sup> | 0.27 ± 0.01 <sup>4)</sup> |

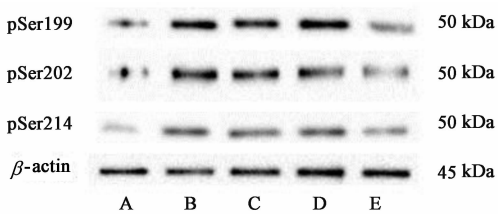


图 1 交泰丸作用小鼠海马组织 tau 蛋白不同位点磷酸化电泳  
Fig. 1 Electrophoresis of JTW on protein expression of tau in hippocampus

3.5 交泰丸对 db/db 小鼠海马 p-Akt, GSK-3 $\beta$ , p-GSK-3 $\beta$  信号转导蛋白的影响 与正常组比较, 模型组小鼠海马 p-Akt, p-GSK-3 $\beta$  表达显著降低 ( $P < 0.01$ ), GSK-3 $\beta$  表达显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组

比较, 交泰丸 3 号组小鼠海马 p-Akt, p-GSK-3 $\beta$  表达显著升高 ( $P < 0.01$ ), GSK-3 $\beta$  表达显著降低 ( $P < 0.01$ ), 说明交泰丸能改善小鼠海马 Insulin/IGF-1 信号转导通路上关键蛋白的表达。见表 5, 图 2。

表 5 交泰丸对小鼠海马 p-Akt, GSK-3 $\beta$ , p-GSK-3 $\beta$  信号转导蛋白的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 5 Effect of JTW on protein expressions of JTW on p-Akt, GSK-3 $\beta$ , p-GSK-3 $\beta$  in hippocampus ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

| 组别      | 剂量/ $g \cdot kg^{-1}$ | p-Akt/ $\beta$ -actin     | GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -actin | p-GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -actin |
|---------|-----------------------|---------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| 正常      | -                     | 1.11 ± 0.02               | 0.43 ± 0.02                    | 1.03 ± 0.03                      |
| 模型      | -                     | 0.32 ± 0.01 <sup>2)</sup> | 1.23 ± 0.03 <sup>2)</sup>      | 0.43 ± 0.02 <sup>2)</sup>        |
| 交泰丸 1 号 | 3.36                  | 0.54 ± 0.03               | 0.97 ± 0.05                    | 0.52 ± 0.03 <sup>3)</sup>        |
| 交泰丸 2 号 | 3.36                  | 0.72 ± 0.06 <sup>3)</sup> | 0.77 ± 0.02 <sup>3)</sup>      | 0.68 ± 0.02 <sup>3)</sup>        |
| 交泰丸 3 号 | 3.36                  | 0.99 ± 0.02 <sup>4)</sup> | 0.48 ± 0.03 <sup>4)</sup>      | 0.96 ± 0.02 <sup>4)</sup>        |

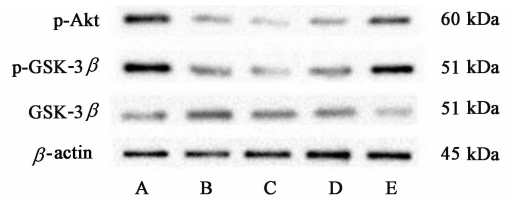


图 2 交泰丸作用小鼠海马 p-Akt, GSK-3 $\beta$ , p-GSK-3 $\beta$  信号转导蛋白电泳  
Fig. 2 Electrophoresis of JTW on protein expressions of p-Akt, GSK-3 $\beta$ , p-GSK-3 $\beta$  in hippocampus

#### 4 讨论

老年 DM 患者合并 AD 的现象越来越受到临床研究的关注, 有学者甚至把 AD 称为“3 型糖尿病”“糖尿病脑病”<sup>[14]</sup>。神经元变性、突触可塑性改变引起的脑萎缩、细胞外 A $\beta$  沉积形成的 SP 和细胞内 tau 蛋白异常磷酸化导致的神经纤维缠结 (NFTs) 是 AD 主要神经病理改变。越来越多的研究证实 2 型 DM 患者脑内同样出现特异性的 AD 样病理改变, 如 A $\beta$  异常沉积和 tau 过度磷酸化<sup>[15]</sup>, 而与胰岛素抵抗相关的 Fins/IGF-1 信号通路障碍是重要因素之一。生理状态下 Fins/IGF-1 及其受体和受体后信号转导蛋白在海马、内嗅区、杏仁核、额颞皮层及与认知功能密切相关的皮层表达丰富, 而 DM, AD 患者脑认知功能相关的区域表达则下降, 其实质是脑内 IR<sup>[16]</sup>。故目前研究认为 IR 可引起认知功能的减退, 尤其是记忆能力的下降, 并增加患 AD 的机会。GSK-3 $\beta$  是 Fins/IGF-1 信号通路下游效应靶点分子, 受上游 Akt 磷酸化的调节。研究表明 GSK-3 $\beta$  是引起 tau 蛋白过度磷酸化的主要蛋白激酶, 而 AD 患者脑中前额皮层、内嗅区皮层的 GSK-3 $\beta$  过度表达<sup>[5]</sup>。

本研究发现,与正常组小鼠比较,db/db 小鼠血糖、血脂、胰岛素抵抗等显著升高;学习记忆及空间探索能力显著降低;海马组织中 tau 蛋白各位点磷酸化水平升高;GSK-3 $\beta$  蛋白表达显著升高,Akt 和 GSK-3 $\beta$  磷酸化水平显著降低。

交泰丸出自《韩氏医通》,由黄连片、肉桂 2 味药组成,一冷一热、一阴一阳,使水火相济,心肾交通,临床常用于心肾不交病证<sup>[17]</sup>。现代药理及临床研究发现,交泰丸具有改善糖脂代谢紊乱的作用,且能更好的改善 2 型 DM 伴失眠病患者的症状<sup>[18]</sup>。这可能与其骨骼肌中胰岛素信号转导途径中 InsR  $\beta$  亚基,IRS-1,磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)-p85 亚基及 GLUT4 蛋白的表达及酪氨酸磷酸化有关<sup>[19-20]</sup>。此外,交泰丸能抑制乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性修复及保护缺血再灌注 VD 大鼠海马区神经元而改善血管性痴呆大鼠学习记忆能力<sup>[21]</sup>;还可调节下丘脑-垂体-肾上腺 (HPA) 轴的分泌活动发挥镇静、催眠和抗抑郁的作用<sup>[10]</sup>。在交泰丸中黄连、肉桂比例研究中发现,黄连-肉桂 2:1 时具有较好的降血糖作用<sup>[6]</sup>,而黄连-肉桂 10:1 时镇静催眠的效果最为理想<sup>[22]</sup>。也有报道称黄连-肉桂 4:1 为最佳有效配比<sup>[23]</sup>。本研究发现,交泰丸 3 号 (黄连-肉桂 10:1) 改善 db/db 小鼠胰岛素抵抗、糖脂水平、学习记忆及空间探索能力效果最佳;其降低海马组织中 tau 蛋白各位点磷酸化水平,GSK-3 $\beta$  蛋白表达;升高 Akt 和 GSK-3 $\beta$  磷酸化水平。

综上,交泰丸交泰丸 3 号 (黄连-肉桂 10:1) 能够改善 DM 小鼠胰岛素抵抗及糖脂水平,缓解认知功能障碍,机制可能是调节 Akt, GSK-3 $\beta$  磷酸化水平,抑制 tau 蛋白过度磷酸化。但交泰丸对其他靶点作用的研究尚少,需进一步完善。

#### [参考文献]

[1] Tiwari S C, Tripathi R K, Farooqi S A, et al. Diabetes mellitus: a risk factor for cognitive impairment amongst urban older adults [J]. *Ind Psychiatry J*, 2012, 21 (1): 44-48.

[2] Velayudhan L, Poppe M, Archer N, et al. Risk of developing dementia in people with diabetes and mild cognitive impairment [J]. *Br J Psychiatry*, 2010, 196 (1): 36-40.

[3] de la Monte S M, Wands J R. Alzheimer's disease is type 3 diabetes-evidence reviewed [J]. *J Diabetes Sci Technol*, 2009, 2 (6): 1101-1113.

[4] Craft S. Insulin resistance and Alzheimer's disease pathogenesis: potential mechanisms and implications for treatment [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2007, 4 (2): 147-152.

[5] PEI J J, Tanaka T, Tung Y C, et al. Distribution, levels,

and activity of glycogen synthase kinase-3 in the Alzheimer disease brain [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1997, 56 (1): 70-78.

[6] 袁琳,李慧姣,胡娜,等.交泰丸不同配比组方降糖作用及相关机制探讨 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23 (8): 130-137.

[7] 龚艳琳,陆付耳,董慧,等.交泰丸及其单味药对大鼠 2 型糖尿病的治疗作用 [J]. *中国医院药学杂志*, 2010, 30 (5): 356-360.

[8] 李慧姣,袁琳,胡娜,等.不同配伍比例交泰丸对 db/db 小鼠降糖作用的比较研究 [J]. *中国中医药科技*, 2017, 24 (2): 153-155, 170.

[9] 胡玉英,胡跃强,张青萍,等.交泰丸联合盐酸多奈哌齐治疗血管性痴呆 45 例临床研究 [J]. *中国医药导报*, 2013, 10 (4): 101-102, 105.

[10] 于春泉,王怡,高杉,等.交泰丸不同配比抗抑郁作用的实验研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18 (6): 225-228.

[11] 全世建,林杏娥,刘妮.交泰丸不同配伍比例的药效学研究 [J]. *中药材*, 2006, 29 (2): 164-166.

[12] Bevins R A, Besheer J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study' recognition memory [J]. *Nat Protoc*, 2006, 1 (3): 1306-1311.

[13] 钱俊青,范菁,童君,等.多不饱和脂肪酸微胶囊改善小鼠学习记忆能力研究 [J]. *浙江工业大学学报*, 2018, 46 (1): 114-118.

[14] Steen E, Terry B M, Rivera E J, et al. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease-is this type 3 diabetes? [J]. *J Alzheimers Dis*, 2005, 7 (1): 63-80.

[15] Jung H J, Park S S, Mok J O, et al. Increased expression of three-repeat isoforms of tau contributes to tau pathology in a rat model of chronic type 2 diabetes [J]. *Exp Neurol*, 2011, 228 (2): 232-241.

[16] Biessels G J, Staekenborg S, Brunner E, et al. Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review [J]. *Lancet Neurol*, 2006, 5 (1): 64-74.

[17] 彭怀仁. *中医方剂大辞典* [M]. 北京:人民卫生出版社, 1995: 669-670.

[18] 全世建,黑赏燕,钱莉莉.加味交泰丸治疗 2 型糖尿病伴失眠 70 例临床观察 [J]. *新中医*, 2012, 44 (12): 85-86.

[19] DONG H, WANG J H, LU F E, et al. Jiaotai pill enhances insulin signaling through phosphatidylinositol 3-kinase pathway in skeletal muscle of diabetic rats [J]. *Chin J Integr Med*, 2013, 19 (9): 668-674.

[20] 李杰,李东华,涂正伟,等.番石榴叶总黄酮促进糖尿病模型小鼠胰岛再生机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23 (10): 116-121.

[21] 胡玉英,刘泰,张青萍.交泰丸对血管性痴呆模型大鼠学习记忆能力及脑组织胆碱能机制的影响 [J]. *重庆医学*, 2012, 41 (1): 209-210.

[22] 王秋,方志军.不同比例交泰丸镇静催眠作用的药效学研究 [J]. *中医临床研究*, 2011, 3 (11): 16-17.

[23] 张潇,高耀,向欢,等.基于网络药理学的交泰丸治疗抑郁症作用机制研究 [J]. *中草药*, 2017, 48 (8): 1584-1590.

[责任编辑 张丰丰]