

· 经典名方 ·

葛根芩连汤加减对糖尿病大鼠海马炎症因子的影响

周莉萍¹, 张效科², 李桂梅¹, 王飞^{1*}

(1. 成都中医药大学, 成都 610075; 2. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046)

[摘要] **目的:** 探讨葛根芩连汤加减对 2 型糖尿病 (T2DM) 大鼠认知功能及海马组织白细胞介素-1 β (IL-1 β), 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和核转录因子- κ B (NF- κ B) 蛋白表达的影响。**方法:** 将 62 只大鼠随机选取 12 只作为空白组, 其余 50 只以高脂高糖饮食及小剂量链脲佐菌素 (STZ) 腹腔注射诱导 2 型糖尿病模型, 随机分为模型组、沙格列汀组、葛根芩连汤加减组。空白组和模型组大鼠分别灌胃蒸馏水 10 mL \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹, 沙格列汀组灌胃沙格列汀 0.005 g \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹, 葛根芩连汤加减组灌胃葛根芩连汤加减 0.435 g \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹; 8 周后, 采用 Morris 水迷宫观察大鼠学习记忆能力; 苏木素-伊红 (HE) 染色法观察海马组织病理变化; 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测海马组织细胞浆和细胞核内 NF- κ B p65 蛋白的表达; 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测大鼠海马组织 IL-1 β , TNF- α 的水平。**结果:** 与正常组比较, 模型组大鼠第 4 天平均潜伏期显著延长 ($P < 0.01$), 逃逸平台进入次数、有效区域运动时间和运动距离均显著降低 ($P < 0.01$), 细胞核内 NF- κ B p65 的蛋白表达显著上升 ($P < 0.01$), 大鼠海马中 IL-1 β , TNF- α 表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 葛根芩连汤加减能明显缩短 T2DM 大鼠逃避潜伏期, 增加穿越平台次数、有效区游泳路程及游泳时间 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 显著改善海马组织 IL-1 β , TNF- α 和细胞核内 NF- κ B p65 蛋白表达水平 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论:** 葛根芩连汤加减可以显著改善高糖高脂饮食加小剂量 STZ 诱导的 T2DM 大鼠模型的学习记忆能力, 其作用机制可能是通过抑制大鼠海马炎症反应来实现的。

[关键词] 糖尿病; 认知障碍; 葛根芩连汤加减; 炎症因子

[中图分类号] R2-0; R285.5; R289; R322.81 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)17-0001-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20191738

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190516.1358.003.html>

[网络出版时间] 2019-05-17 10:08

Effect of Modified Gegen Qinlian Tang on Inflammatory Factors in Hippocampus for Diabetic Rats

ZHOU Li-ping¹, ZHANG Xiao-ke², LI Gui-mei¹, WANG Fei^{1*}

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China;

2. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of modified Gegen Qinlian Tang on learning and memory ability and interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), nuclear factor- κ B (NF- κ B) protein expression in hippocampus of type 2 diabetic (T2DM) rats. **Method:** A total of 62 rats were randomly divided into normal group ($n = 12$), and the remaining 50 rats were established by feeding high sugar and high fat diet and injecting with low dosage of streptozocin (STZ) to T2DM. The successful modeling rats were selected and randomly divided into model group, Saxagliptin and modified Gegen Qinlian Tang group. The normal group and the model group received 10 mL \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹ normal saline by intragastric administration. 0.005 g \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹ Saxagliptin crude drug and 0.435 g \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹ modified Gegen Qinlian Tang crude drug were given in Saxagliptin group and modified Gegen Qinlian Tang group, and all the treatment lasted for 8 weeks. Learning and memory ability of rats was observed by using Morris water maze. Histopathological changes of hippocampus was observed by hematoxylin-

[收稿日期] 20190219(022)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81774304)

[第一作者] 周莉萍, 在读博士, 从事中医药防治内分泌代谢疾病的临床与实验研究, E-mail: zlp crystal@sina.com

[通信作者] *王飞, 博士, 教授, 从事中医药防治呼吸病与老年病的临床与实验研究, E-mail: wangfei666v@163.com

eosin staining. Western blot was used to test the NF- κ B p65 in the cytoplasmic and nucleus in rat hippocampus. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to test the levels of IL-1 β and TNF- α . **Result:** Compared with normal group, the mean incubation period of model group was significantly prolonged on the 4th day ($P < 0.01$), the number of escape platform entry, the movement time and distance of the effective area were significantly decreased ($P < 0.01$), the protein expression of NF- κ B p65 in the nucleus was significantly increased ($P < 0.01$), and the expression levels of IL-1 β , TNF- α in the hippocampus were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with normal group, modified Gegen Qinlian Tang could increase the number of crossing platform ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the platform of swimming distance and swimming time ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The expression levels of IL-1 β , TNF- α and NF- κ B p65 in hippocampus were significantly improved. **Conclusion:** Modified Gegen Qinlian Tang could obviously improve the learning and memory ability of the T2DM rat model which was induced by the high-sugar, high-lipid diet and low-dose STZ, and the mechanism may be achieved by suppressing the inflammation of the rat's hippocampus.

[**Key words**] diabetes; cognitive dysfunction; modified Gegen Qinlian Tang; inflammatory factor

随着社会经济的发展和人们生活方式的改变,糖尿病已经逐渐成为全球范围的慢性流行性疾病,其发病率日益增高并将持续增长^[1]。糖尿病可能带来多种并发症,其中糖尿病脑病是一种主要的中枢神经系统并发症,包含产生认知功能障碍和改变患者大脑的神经生理及结构^[2-3]。糖尿病对患者大脑的损伤是一个长期而复杂的过程,在近年来的实验和临床研究中,糖尿病引起的认知功能障碍逐渐受到了重视。患者常表现为学习记忆能力减退,信息处理能力下降,并且伴有神情冷漠、反应迟钝,甚至发展成为痴呆^[4]。由于目前关于糖尿病导致认知功能障碍的发病机制尚不明确,因此现阶段也没有有效的具有针对性的治疗方案,导致该疾病给社会和家庭造成了沉重的负担。葛根芩连汤加减方由出自《伤寒论》的经典名方葛根芩连汤加减而来,在前期研究中,已发现该方可以有效保护糖尿病大鼠微血管的结构,促进血脑屏障损伤的修复^[5]、改善糖尿病大鼠海马缺氧缺血状态^[6]、减轻糖尿病大鼠海马区神经元损害^[7]等,从而改善糖尿病大鼠学习记忆能力。核转录因子- κ B(NF- κ B)是一种炎症因子,在高糖及氧化应激等环境下,NF- κ B 表达增强导致一氧化氮(NO),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等因子的表达也发生改变,继而引起一系列的病理变化,造成海马神经元细胞凋亡,从而导致糖尿病认知功能障碍的发生^[8]。近年来有研究显示中药能通过降低 NF- κ B 的表达,从而改善糖尿病认知功能障碍^[9-10]。本研究在前期研究基础上,针对葛根芩连汤加减对糖尿病大鼠模型炎症反应的影响进行研究,通过检测糖尿病大鼠海马细胞核内和细胞浆内 NF- κ B p65 的蛋白表达以及大鼠海马内白细胞介素

(IL)-1 β , TNF- α 表达水平,进一步探讨葛根芩连汤加减防治糖尿病认知功能障碍的机制。

1 材料

1.1 动物 健康雄性 SPF 级 SD 大鼠 62 只,体质量(200 \pm 20) g,购自成都达硕生物科技有限公司,许可证号 SYXK(川)2015-0030。大鼠均饲养于成都中医药大学实验动物研究中心,室内保持 12 h 光照,12 h 避光循环饲养,且维持温度(23 \pm 2) $^{\circ}$ C,相对湿度 40%,给予标准饲料和饮用水。动物实验的开展取得了成都中医药大学实验动物伦理委员会批准,编号 ACCDU-2015-116。

1.2 药物 葛根芩连汤加减由葛根 12 g,石斛 12 g,黄连片 6 g,黄芩片 9 g,三七粉 3 g,熊胆粉 1.5 g 组成,上述葛根、石斛、黄连片、黄芩片均购自成都中医药大学附属医院中药房,三七粉、熊胆粉购自成都同仁堂,并经成都中医药大学药学院陈敏教授鉴定,符合中国药典规定。药液制备:按葛根 12 g,石斛 12 g,黄连片 6 g,黄芩片 9 g 配比,共 39 g 药材加水 400 mL 煎煮 2 h,浓缩为含生药 0.39 g \cdot mL⁻¹的水煎剂,4 $^{\circ}$ C 冰箱冷藏。灌胃时取预计量的水煎剂 37 $^{\circ}$ C 水浴,加入相应比例的熊胆粉、三七粉制成含生药 0.435 g \cdot mL⁻¹的葛根芩连汤加减混悬液灌胃。沙格列汀片(安立泽,中美上海施贵宝制药有限公司,5 mg/片,批号 4M5R7145)。

1.3 试剂 链脲佐菌素(STZ,美国 Sigma 公司,批号 101791881); IL-1 β , TNF- α 酶联免疫吸附测定(ELISA)检测试剂盒(上海西唐生物科技有限公司,批号分别为 F15810, F16960);生物素化山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(英国 Abcam 公司,批号 SA00001); NF- κ B p65 兔多克隆抗体,甘油醛-3-磷酸脱氢酶

(GAPDH), 增殖细胞核抗原 (PCNA) (武汉 Protein tech 公司, 批号分别为 60004-1, 10205-2-AP, 10745-1-AP); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (南京凯基生物科技发展有限公司, 批号 KGP903); ECL 发光试剂盒 (美国 Thermo 公司, 批号 32209); 苏木素-伊红 (HE) 染色试剂盒 (上海碧云天公司, 批号 C0105)。

1.4 仪器 罗氏 ROCHT 型血糖仪 (德国 Accu-chek 公司); WMT-100Morris 型水迷宫视频分析系统 (成都泰盟科技有限公司); BSA224S-CW 型电子分析天平 (德国 Sartorius 公司); RM2015 型石蜡切片机 (美国 Leica 公司); PHY-3 型病理组织漂烘仪 (常州市郊区中威电子仪器厂); BX41 型光学显微镜, DP72 型显微镜成像系统, cellSens 型显微图像软件 (日本 Olympus 公司); WellscanMK3 型多功能酶标仪, Wellwash4MK2 型洗板机 (芬兰 Thermo 公司); PYX-DHS 型数字显示隔水式电热恒温培养箱 (上海跃进医疗器械厂); TGL-168 型离心机 (上海安亭科学仪器厂); XW-80A 型旋涡混合器 (上海青浦沪西仪器厂); DHG-9023A 型电热恒温鼓风干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司); MK200-2 型干式恒温器 (杭州奥盛仪器有限公司); EPS-600 型电泳仪, VE186 型转移电泳槽 (上海天能科技有限公司); Trans-Blot 型转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司); ClineX ChemiScope 系列荧光及化学发光成像系统 (上海勤翔科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 动物模型制备 大鼠适应性喂养 3 d, 随机分出 12 只作为空白组, 给予普通基础饲料喂养; 其余 50 只作为造模组给予高糖高脂饲料喂养 (10% 猪油, 10% 蔗糖, 2.5% 胆固醇, 77.5% 基础饲料), 4 周后间隔 2 d 分 2 次腹腔注射 0.25% STZ 柠檬酸溶液, 72 h 后尾静脉采血测血糖, 血糖仪测血糖 $\geq 16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的大鼠认为糖尿病模型建立成功^[11-12]。

2.2 给药方法 将 49 只造模成功的大鼠随机分为模型组 17 只 (纯净水 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃)、葛根芩连汤加减组 16 只 ($0.435 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃)、沙格列汀组 16 只 ($0.005 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃), 空白组大鼠采用纯净水 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃, 连续给药 8 周。根据体表系数法计算大鼠给药剂量^[13], 灌胃期间大鼠用普通饲料喂养。

2.3 Morris 水迷宫实验 给药 8 周后, 以抽签法对每组大鼠随机选取 9 只, 共计 36 只进行水迷宫实验。第 1 至 4 天为定位航行实验, 设置程序将水池

按“十”字划分为 4 个象限, 每个象限池壁边缘中点为入水点, 将平台固定于第 4 象限中心, 平台距水面距离 1.5 cm。然后将大鼠从第 1, 2, 3 象限入水点分别放入水中, 入水时保持头部面向池壁。如大鼠找到并爬上平台, 则记录其所需时间, 即潜伏期, 并让大鼠在平台上休息 15 s; 如大鼠在 90 s 内仍未找到平台, 则将其捞起置于平台上休息 15 s, 并将潜伏期记录为 90 s; 将同 1 只大鼠 1 d 内 3 次实验结果的算术平均数作为当天的成绩加以记录。第 5 天为空间探索实验, 撤除平台, 将大鼠如前几日一样放入水中, 记录大鼠在 90 s 内到达原逃逸平台所在位置的次数、在有效区 (逃逸平台直径 2 倍范围内) 的停留时间和运动路程。

2.4 HE 染色观察海马组织病理学变化 各组大鼠在最后 1 d 水迷宫实验后, 立刻麻醉处死大鼠, 于 0 °C 冰盘上断头, 迅速取其海马组织, 置于 10% 甲醛溶液固定, 之后采用梯度上行乙醇脱水, 再置于二甲苯中透明, 在溶蜡箱中浸蜡包埋, 切片厚 5 ~ 8 μm , 贴于载玻片上, 放入 45 °C 恒温箱烘干。之后将切片脱蜡入水, 依次以苏木素及伊红染色, 再采用梯度上行乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树脂胶封固。在光学显微镜下确认海马结构的不同区域和组织分层, 观察各组大鼠海马神经元的病理变化。

2.5 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测海马组织中 NF- κ B p65 蛋白的表达 在最后 1 d 水迷宫实验后, 立刻麻醉处死大鼠, 于 0 °C 冰盘上断头, 迅速取其海马组织, 称质量后, 按 $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 加入预冷的裂解液, 在冰浴环境中匀浆, 置于 4 °C 离心机内 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 分别提取细胞核蛋白和细胞浆蛋白, 保存于 -80 °C 备用。用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度, 蛋白经 10% SDS-PAGE 电泳分离后, 转移至 PVDF 膜上, 加入一抗 (1:1 000), 内参 PCNA (1:5 000) 及 GAPDH (1:5 000)。4 °C 孵育过夜, 洗膜后以二抗 (1:5 000) 孵育 1 h, ECL 法显色, 暗室中用 X 胶片感光、显影、定影, 采用 IPP 6.0 软件进行灰度值分析, 分别计算细胞核内蛋白与 PCNA, 细胞浆内蛋白与 GAPDH 的灰度比值。

2.6 ELISA 检测大鼠海马中 IL-1 β , TNF- α 含量 大鼠麻醉断头处死后, 低温条件下迅速取海马组织, 以生理盐水冲洗, 滤纸吸干, 称质量后置于匀浆器中匀浆, 取上清液, 放于 4 °C 冰箱保存, 采用 ELISA 检测各组海马中 IL-1 β , TNF- α 的含量, 具体步骤按相应的试剂盒说明书操作, 在 450 nm 处测吸光度 A。

2.7 统计方法 采用 SPSS 21.0 统计软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验,方差不齐时用 Tampane's T2 法,不符合正态分布则用秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 葛根芩连汤加减对大鼠行为学的影响

3.1.1 对大鼠定位航行实验潜伏期的影响 结果显示不同组别的大鼠在 4 d 的定位航行实验中,平均潜伏期时间均有一定程度的缩短,说明各组大鼠寻找平台的能力在学习训练中均有一定程度的提高。与空白组比较,模型组大鼠第 4 天平均潜伏期显著延长 ($P < 0.01$);与模型组比较,葛根芩连汤加减组和沙格列汀组的大鼠的平均潜伏期显著缩短

($P < 0.01$)。见表 1。

3.1.2 对大鼠空间探索实验的影响 在撤除平台后,可以观察到模型组大鼠的游动轨迹以贴近池壁为主,在水迷宫外环停留时间较长,到达原逃逸平台所在位置的机会较少,整个运动轨迹随机分布于各象限,并无一定规律。经统计学分析,模型组大鼠的逃逸平台进入次数、有效区域运动时间和运动距离均显著低于空白组 ($P < 0.01$)。葛根芩连汤加减组和沙格列汀组的大鼠在逃逸平台进入次数和有效区域运动时间上均显著高于模型组 ($P < 0.01$),组间比较无明显差异。此外,葛根芩连汤加减组大鼠在有效区域运动距离上也明显高于模型组 ($P < 0.05$),而沙格列汀组大鼠在该指标上与模型组无明显统计学差异。见表 2。

表 1 葛根芩连汤加减对大鼠水迷宫定位航行实验潜伏期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

| 组别 | 剂量/ $g \cdot kg^{-1}$ | 第 1 天 | 第 2 天 | 第 3 天 | 第 4 天 |
|---------|-----------------------|---------------|---------------|---------------|----------------------------|
| 空白 | - | 60.11 ± 14.41 | 31.48 ± 6.58 | 17.93 ± 5.52 | 13.78 ± 6.53 |
| 模型 | - | 63.74 ± 14.33 | 38.07 ± 9.47 | 36.63 ± 10.53 | 30.93 ± 7.80 ¹⁾ |
| 葛根芩连汤加减 | 0.435 | 57.74 ± 9.83 | 35.96 ± 11.95 | 26.45 ± 10.02 | 15.26 ± 5.89 ²⁾ |
| 沙格列汀 | 0.005 | 58.70 ± 15.31 | 37.56 ± 9.70 | 30.93 ± 12.03 | 16.74 ± 3.37 ²⁾ |

注:与空白组同期比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组同期比较²⁾ $P < 0.01$ 。

表 2 葛根芩连汤加减对大鼠水迷宫空间探索实验的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

| 组别 | 剂量/ $g \cdot kg^{-1}$ | 逃逸平台进入次数/次 | 有效区域运动时间/s | 有效区域运动路程/mm |
|---------|-----------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------------|
| 空白 | - | 6.33 ± 1.94 | 3.63 ± 0.55 | 676.97 ± 64.42 |
| 模型 | - | 3.22 ± 0.97 ¹⁾ | 2.37 ± 0.37 ¹⁾ | 575.14 ± 65.04 ¹⁾ |
| 葛根芩连汤加减 | 0.435 | 5.67 ± 2.00 ³⁾ | 3.28 ± 0.44 ³⁾ | 646.52 ± 68.52 ²⁾ |
| 沙格列汀 | 0.005 | 5.33 ± 1.41 ³⁾ | 3.18 ± 0.39 ³⁾ | 620.82 ± 70.13 |

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 4 同)。

3.1.3 对大鼠海马神经元细胞形态学的影响 HE 染色后在光学显微镜下观察发现,空白组大鼠海马神经元形态正常,细胞排列紧密整齐,层级明显,细胞呈圆形,细胞膜边界规则完整,细胞核清晰可见。模型组海马神经元排列稀疏、杂乱,层级减少,细胞结构欠清晰,出现核固缩坏死神经元,可见明显的胶质细胞增生现象。葛根芩连汤加减组及沙格列汀组大鼠海马神经元上述病理改变较模型组显著减轻,细胞数量明显增多,空泡化减少,但两组间差异不明显。见图 1。

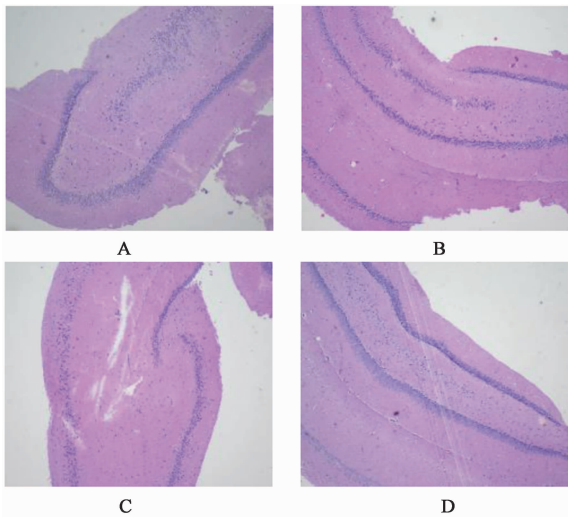
3.1.4 对大鼠细胞核内和细胞浆内 NF- κ B p65 蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组细胞核内 NF- κ B p65 的蛋白表达显著上升 ($P < 0.01$),细胞

浆内 NF- κ B p65 的蛋白表达明显下降 ($P < 0.05$);与模型组比较,葛根芩连汤加减组和沙格列汀组细胞核内 NF- κ B p65 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$),细胞浆内 NF- κ B p65 的蛋白表达有下降趋势,但无统计学差异。见图 2,表 3。

3.2 对大鼠海马内 IL-1 β , TNF- α 含量的影响 与空白组比较,模型组大鼠海马中 IL-1 β , TNF- α 表达水平明显升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,葛根芩连汤加减组、沙格列汀组的大鼠海马中 IL-1 β , TNF- α 含量明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 4。

4 讨论

炎症反应贯穿于糖尿病及其引起的认知功能障碍等病程发生发展的全过程。已经有研究显示,伴



A. 空白组; B. 模型组; C. 葛根芩连汤加减组; D. 沙格列汀组(图 2 同)
图 1 葛根芩连汤加减对各组大鼠海马神经元细胞形态学的影响
Fig.1 Effect of modified Gegen Qinlian Tang on morphology of hippocampal neurons of rats in different groups

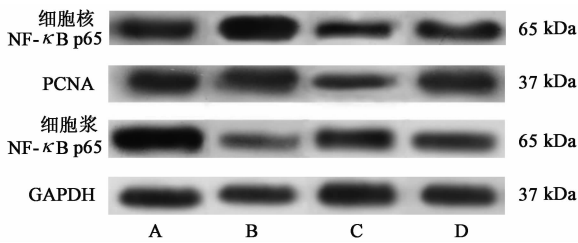


图 2 大鼠细胞核和细胞浆内 NF-κB p65 蛋白表达电泳
Fig.2 Electrophoresis of protein expressions of NF-κB p65 in nucleus and cytoplasm of rats

表 3 葛根芩连汤加减对大鼠细胞核内和细胞浆内 NF-κB p65 蛋白表达量的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Table 3 Effect of modified Gegen Qinlian Tang on expression of NF-κB p65 in nucleus and cytoplasm of rats($\bar{x} \pm s, n = 8$)

| 组别 | 剂量 /g·kg ⁻¹ | 细胞核 NF-κB p65 /PCNA | 细胞浆 NF-κB p65 /GAPDH |
|---------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 空白 | - | 0.780 ± 0.174 | 0.745 ± 0.437 |
| 模型 | - | 1.121 ± 0.372 ²⁾ | 0.419 ± 0.112 ¹⁾ |
| 葛根芩连汤加减 | 0.435 | 0.870 ± 0.128 ³⁾ | 0.534 ± 0.227 |
| 沙格列汀 | 0.005 | 0.808 ± 0.180 ³⁾ | 0.489 ± 0.240 |

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

有认知功能障碍的糖尿病患者的血清中 IL-1β, IL-6 及 TNF-α 等炎症因子的水平均显著高于不伴有认知功能障碍的糖尿病患者^[14]。目前一般认为,在学习记忆有关的海马区内存在着大量的小胶质细胞,这些小胶质细胞起源于单核吞噬细胞系,是中枢神经系统中固有的吞噬细胞,在正常的生理条件下

表 4 葛根芩连汤加减对各组大鼠海马内 IL-1β, TNF-α 表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effect of modified Gegen Qinlian Tang on expression levels of IL-1β and TNF-α in hippocampus of rats in different groups ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

| 组别 | 剂量 /g·kg ⁻¹ | IL-1β | TNF-α |
|---------|---------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| 空白 | - | 35.30 ± 6.93 | 64.70 ± 8.97 |
| 模型 | - | 76.37 ± 43.18 ¹⁾ | 153.75 ± 61.47 ¹⁾ |
| 葛根芩连汤加减 | 0.435 | 45.39 ± 13.33 ²⁾ | 89.83 ± 36.49 ³⁾ |
| 沙格列汀 | 0.005 | 46.70 ± 18.12 ²⁾ | 87.01 ± 43.55 ³⁾ |

处于静态。但是当其受到如高血糖、活性氧(ROS)等刺激时,就会迅速被激活,出现反应性增生,过度活化和增殖的小胶质细胞将会显著性长时间的产生大量如 IL-6, IL-1β, TNF-α 等细胞因子^[15],导致脑内大量神经元细胞的凋亡,使得认知功能障碍逐渐加重。同时,长期的慢性炎症会改变血脑屏障通透性^[16],造成大量有毒物质进入脑内,进一步加剧认知功能障碍。已有实验证实,伴有认知功能障碍的糖尿病大鼠海马区的小胶质细胞大量活化,并检测到海马组织中 TNF-α, IL-1β, IL-6 等细胞因子的表达上调,从而证明炎症反应可能是糖尿病诱发认知功能障碍的作用机制之一^[17]。

NF-κB 被看作是炎症因子的开关,在炎症和免疫反应中发挥重要作用。NF-κB 通路的激活可以从多种途径诱发胰岛素抵抗,损伤胰岛 β 细胞导致糖代谢紊乱^[18-19]。当细胞处于静息状态时,NF-κB 主要存在于细胞浆中,但一旦受到如高血糖等环境的长期刺激后,NF-κB 则会活化,并从细胞浆易位至细胞核^[20]。被激活后的 NF-κB 可以启动和调节如 IL-6, TNF-α 等炎症因子,而这些炎症因子又会进一步激活 NF-κB,从而形成恶性循环,导致炎症反应的不断加重。

中医古籍中并无糖尿病认知功能障碍的确切记载,根据其临床表现应属中医消渴呆病的范畴,也可参考“呆病”“健忘”论治。本课题组前期研究认为其病机与虚、瘀、毒有关^[21]。葛根芩连汤是记载于中医经典著作《伤寒论》里的名方,为表里双解剂,具有解表清里之功效,历代医家主要用于治疗湿热泻痢。近年来有张发荣教授^[22]、仝小林教授^[23]等根据“异病同治”的指导思想,将其应用于糖尿病的治疗,取得了显著的效果。

葛根芩连汤加减是王飞教授根据“糖尿病认知功能障碍的主要病机为阴虚燥热、毒瘀阻络”的理论基础,在临床实践中逐渐形成的经验方。该方由

葛根、石斛、黄连片、黄芩片、三七粉、熊胆粉组成,其中葛根、石斛养阴生津为君药,黄连片、黄芩片苦寒清热燥湿、泻火解毒,共为臣药,加入熊胆粉清热解毒、活血开窍,三七粉活血化瘀为佐药。该方剂经初步临床研究显示可以较好的改善糖尿病患者的认知功能^[24]。

本实验通过 Morris 水迷宫实验证实葛根苓连汤加减可以有效提高糖尿病大鼠的学习记忆能力,改善其认知功能障碍。通过对糖尿病大鼠海马组织细胞核内 NF- κ B p65 活性的检测,证实了糖尿病会激活 NF- κ B,使其大量从细胞浆内易位至细胞核,而对糖尿病大鼠采用葛根苓连汤加减灌胃后,可以有效缓解或逆转 NF- κ B 的激活。由于 NF- κ B 被视作炎症因子的开关,其被激活后,会导致炎症因子大量产生,本实验通过对大鼠海马组织中 IL-1 β , TNF- α 的含量的检测也证实了这一点,同样的,大鼠在采用葛根苓连汤加减灌胃后,IL-1 β , TNF- α 的含量也出现了显著的下降。说明葛根苓连汤加减可能是通过降低糖尿病大鼠细胞核内 NF- κ B p65 蛋白表达水平,降低大鼠海马组织内 IL-1 β , TNF- α 的表达,抑制大鼠机体炎症反应,从而达到改善大鼠认知功能障碍的目的。但关于本方改善糖尿病认知功能障碍的其他作用机制仍需进一步实验,以期为临床应用提供客观依据。

[参考文献]

[1] Sarah W, Gojka R, Anders G, et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030 [J]. *Diabetes Care*, 2004, 27(5): 1047-1053.

[2] Gábor M S, Barbara K, Eva R, et al. Soluble semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) activity is related to oxidative stress and subchronic inflammation in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Neurochem Int*, 2006, 48(8): 746-752.

[3] Ozer S, Ayfer T, Gülden Z O, et al. Protective effect of resveratrol against naphthalene-induced oxidative stress in mice [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2008, 71(1): 301-308.

[4] 苏杰英,李宏亮,杨文英. 糖尿病性认知功能障碍: 一个不容忽视的问题 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2008, 24(5): 476-479.

[5] 袁有才,张效科,问莉娜,等. 新葛根苓连汤对糖尿病大鼠血脑屏障通透性及 occludin/Claudin-5 蛋白表达的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2018, 29(9): 2108-2111.

[6] 袁有才,张效科,高碧峰,等. 新葛根苓连汤对糖尿病大鼠海马 HIF-1 α 及 VEGF 的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2018, 29(2): 269-271.

[7] 袁有才,高碧峰,王飞,等. 新葛根苓连汤对糖尿病大鼠海马 PI3K/Akt/CREB mRNA 表达的影响 [J]. *四川中医*, 2018, 36(10): 31-33.

[8] 潘玉萍,李树德,邹英鹰. NF- κ B 及其相关因子与糖尿病认知功能障碍关系的研究进展 [J]. *医学研究生学报*, 2016, 29(7): 754-758.

[9] 毛小元,周宏灏,刘昭前. 蛇床子素通过抑制 PI3K/Akt 信号通路减轻糖尿病脑病的炎症反应 [J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(17): 4743-4746.

[10] 刘继平,程玥,关建建,等. 七福饮对糖尿病脑病模型大鼠认知障碍及神经病理改变的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2015, 31(5): 15-19.

[11] 张玉领,孙长颖. 2 型糖尿病动物模型的研究进展 [J]. *实用糖尿病杂志*, 2011, 7(4): 7-9.

[12] 林心君,王麒又,辛金钟,等. 高成模率和高稳定性的糖尿病大鼠模型制备——高脂高糖膳食 + STZ 体重联合体表面积法构建糖尿病大鼠模型 [J]. *中国老年学杂志*, 2013, 33(9): 2051-2054.

[13] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(9): 1069-1072.

[14] Riccardo E M, Mark W J S, Rebecca M R, et al. Association between raised inflammatory markers and cognitive decline in elderly people with type 2 diabetes: the Edinburgh type 2 diabetes study [J]. *Diabetes*, 2010, 59(3): 710-713.

[15] Hwang I K, Choi J H, Nam S M, et al. Activation of microglia and induction of pro-inflammatory cytokines in the hippocampus of type 2 diabetic rats [J]. *Neurol Res*, 2014, 36(9): 824-832.

[16] Acharya N K, QI X, Goldwaser E L, et al. Retinal pathology is associated with increased blood-retina barrier permeability in a diabetic and hypercholesterolaemic pig model: beneficial effects of the LpPLA₂ inhibitor Darapladib [J]. *Diabetes Vasc Dis Res*, 2017, 14(3): 200-213.

[17] SONG G J, Jung M, Kim J, et al. A novel role for protein tyrosine phosphatase 1B as a positive regulator of neuroinflammation [J]. *J Neuroinflammation*, 2016, 13(1): 86.

[18] 吴帆,刘圣徽,朱金华,等. 乌梅丸对 2 型糖尿病模型大鼠 NF- κ B p65 及 GLP-1 的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(21): 144-148.

[19] CAI K, QI D, HOU X, et al. MCP-1 upregulates amylin expression in murine pancreatic β cells through ERK/JNK-API and NF- κ B related signaling pathways independent of CCR2 [J]. *PLoS One*, 2011, 6(5): e19559.

[20] 冷锦红,于世家. 糖尿病与 NF- κ B 信号转导通路 [J]. *中华中医药学刊*, 2008, 26(6): 1248-1250.

[21] 袁有才,问莉娜,曹旻,等. 糖尿病认知功能障碍的中医病因病机研究进展 [J]. *光明中医*, 2016, 31(24): 3687-3690.

[22] 王芬,何华亮. 张发荣运用葛根苓连汤治疗糖尿病经验 [J]. *中医杂志*, 2005, 46(2): 103.

[23] 赵林华,连凤梅,姬航宇,等. 全小林教授运用不同剂量葛根苓连汤治疗 2 型糖尿病验案 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(4): 249-251.

[24] 薛久开. 新加葛根苓连汤治疗 2 型糖尿病认知障碍的临床疗效观察 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2016.

[责任编辑 孙丛丛]