

涤痰汤糖尿病大鼠认知功能障碍的保护作用及机制

杨光磊¹ 王国强¹ 米 佳¹ 王秀阁²

(1 长春中医药大学, 长春, 130000; 2 长春中医药大学附属医院内分泌代谢病科, 长春, 130000)

摘要 目的: 观察涤痰汤对糖尿病大鼠认知能力的影响, 并探讨其对 PI3K-AKT 信号通路相关因子的影响。方法: 将 30 只 SD 鼠纳入研究, 随机分为正常对照组、模型组及涤痰汤组, 其中模型组及涤痰汤组大鼠均接受糖尿病模型制备, 涤痰汤组用 0.88 g/mL 涤痰汤药液灌胃, 正常对照组及模型组用等量的生理盐水灌胃, 3 组均连续灌胃 28 d。各组采用水迷宫评估大鼠学习记忆功能, Tunel 检测神经元细胞凋亡情况, HE 染色法观察海马组织病理结构改变, Western blotting 法检测各组海马组织 PI3K、AKT、p-AKT、Bax 及 Bcl-2 蛋白水平变化。结果: 涤痰汤可明显改善糖尿病模型大鼠的学习记忆能力, 抑制神经元凋亡率及 Bax 水平, 增加海马区 PI3K、p-AKT、Bcl-2 蛋白表达。结论: 涤痰汤可明显改善糖尿病模型大鼠的认知, 其作用机制可能与介导 PI3K/AKT 信号通路有关。

关键词 糖尿病模型; 学习记忆能力; 涤痰汤; 水迷宫; 海马; 凋亡; PI3K-AKT 信号通路; 神经保护

Protective Effects and Mechanism of Ditan Decoction on Cognitive Dysfunction in Diabetic Rats

Yang Guanglei¹, Wang Guoqiang¹, Mi Jia¹, Wang Xiuge²

(1 Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130000, China; 2 Department of Endocrine and Metabolic Diseases, Affiliated Hospital of Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130000, China)

Abstract Objective: To observe the effects of Ditan decoction on cognitive ability of diabetic rats and to explore the effects of Ditan decoction on PI3K-AKT signaling pathway related factors. **Methods:** A total of 30 SD rats were randomly divided into a normal control group, a model group and a Ditan decoction group. Rats in the model group and the Ditan decoction group were all prepared by the diabetic model, and the rats in the Ditan decoction group were treated with 0.88 g/mL Ditan decoction by gavage. The normal control group and the model group were given the same amount of normal saline intragastrically, and the 3 groups were continuously intragastrically administered for 28 days. The learning and memory function of rats in each group was evaluated by water maze, and the apoptosis of neurons was detected by tunnel. The pathological changes of hippocampus were observed by HE staining, and the levels of PI3K, AKT, p-AKT, Bax and Bcl-2 protein in hippocampus of each group were detected by Western blotting. **Results:** Ditan decoction could significantly improve the learning and memory ability of diabetic rats, inhibited the neuronal apoptosis rate and the level of Bax, and increased the expression of PI3K, p-AKT and Bcl-2 protein in hippocampus. **Conclusion:** Ditan decoction can significantly improve the cognition of diabetic rats, and its mechanism may be related to the mediation of PI3K/AKT signaling pathway.

Key Words Diabetic model; Learning and memory ability; Ditan decoction; Water maze; Hippocampal; Apoptosis; PI3K-AKT signaling pathway; Neuroprotection

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2019.05.021

近年来越来越多的学者意识到研究糖尿病对认知的损伤具有重要临床意义, 有文献^[1-2]证实高血糖是导致认知障碍的独立危险因素, 糖尿病患者罹患血管性痴呆的比例是普通人群的 2.5 倍, 解剖学显示糖尿病脑病的病理变化与阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 即为相似, 因此糖尿病患者是血管性痴呆的高危人群。

糖尿病脑损害引发的认知障碍属于中医学“健

忘”“善忘”“呆病”等范畴, “百病多由痰作祟”“怪病多痰”, 现代中医从“痰”入手治疗认知相关性疾病亦确有疗效。涤痰汤源自明代方贤著的《奇效良方》, 具有涤痰开窍的功效, 现代中医将其大量应用于认知及情志相关的疾病治疗^[3-5], 获得了较为理想的疗效。但对其作用机制目前尚无统一定论, 由此本团队以糖尿病模型为观察对象, 探讨其相关机制, 具体报道如下。

基金项目: 吉林省重点科技攻关项目 (20160204010YY); 长春中医药大学科研项目 (FK201801)

作者简介: 杨光磊 (1991.01—), 女, 硕士研究生在读, 研究方向: 消渴病的研究, E-mail: 4674470@qq.com

通信作者: 王秀阁 (1966.11—), 女, 博士, 主任医师, 博士研究生导师, 二级教授, 研究方向: 内分泌代谢系统疾病发病机制和防治方法, E-mail: 362730191@qq.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 30 只 SPF (Speciifc Psthogen Free) 级 SD 雄性大鼠纳入本研究,均购自长沙市天勤生物有限公司;许可证号为 scxk (湘) 2014-0010, scxk (湘) 2014-0011。体质量 180 ~ 220 g, 平均体质量 (201 ± 1.92) g, 鼠龄 4 ~ 6 个月, 平均鼠龄 (5 ± 0.11) 个月。所有大鼠均饲养于长春中医药大学实验中心 SPF 级实验动物房, 室温控制在 (22 ± 1) °C, 湿度 (54 ± 2) %, 12 h/12 h 交替光照。

1.1.2 药物 制备涤痰汤药液, 成分如下: 人参 15 g、制南星 10 g、生姜 10 g、法半夏 10 g、枳壳 10 g、茯苓 15 g、橘红 10 g、甘草 3 g、竹茹 10 g。整方药材置于全自动煎药机中浸泡 30 min, 水煎煮后滤出药液, 再次加水煎煮后滤出药液, 将 2 次药液混匀后浓缩为 0.88 g/mL 的药液, 置于 -20 °C 备用。

1.1.3 仪器与试剂 Morris 水迷宫 (购自江苏赛昂斯公司), Model68 酶标仪 (购自美国 Bio-Rad Laboratories), 全自动煎药机 (购自济南玖延机械厂); PI3K 一抗抗体 (购自美国 CST 公司, 4249T)、AKT 一抗抗体 (购自美国 CST 公司, 46855)、p-AKT 一抗抗体 (购自美国 CST 公司, 40605)、Bcl-2 一抗抗体 (购自美国 CST 公司, 15071T)、Bax 一抗抗体 (购自美国 CST 公司, 14796S)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 将 30 只 SD 大鼠按照随机数字法分为正常对照组、模型组和涤痰汤组, 每组 10 只。3 组大鼠在鼠龄、体质量、饲养环境等方面比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性。其中正常对照组予自由饮水及摄食, 模型组及涤痰汤组大鼠参照参考文献^[6]予高脂饮食连续喂养 4 周, 禁食 24 h 后按照 35 mg/kg 比例腹腔注射链脲佐菌素溶液, 正常对照组相同比例腹腔注射柠檬酸缓冲液, 72 h 取尾静脉血测血糖, 当血糖 ≥ 11.1 mmol/L 时视为造模成功。将造模成功的大鼠进行 Morris 水迷宫测试其学习记忆能力, 根据文献^[6]可知成模后第 10 周大鼠出现学习记忆能力下降, 故我们从成模后第 10 周开始中药干预。

1.2.2 干预方法 正常对照组正常饲养, 按照 0.88 g/(mL · d) 比例灌胃生理盐水, 1 次/d, 连续灌胃 28 d 后处死; 模型组成模后按照 0.88 g/(mL · d) 比例灌胃生理盐水, 1 次/d, 连续灌胃 28 d 后处死。涤痰汤组成模后涤痰汤灌胃干预, 按照 0.88 g/(mL · d) 予中药汤剂灌胃, 1 次/d, 连续治疗

28 d 后处死。

1.2.3 检测指标与方法

1.2.3.1 行为学检测 1) Morris 水迷宫测试: 连续干预 28 d 后将各组大鼠置于 Morris 水迷宫总进行定位航行实验及空间探索实验, 水迷宫直径 214 cm, 高 50 cm, 底黑, 水池均分为 4 个部分, 分别标记成第一象限、第二象限、第三象限及第四象限。水池里注入清水, 高 30 cm, 池中设置一圆形平台, 直径大小约 10 cm, 记录视频放置于平台正上方。2) 定位航行实验: 在平台象限外随机选取一个入水点, 将各组大鼠头部背对平台放入水中, 记录大鼠找到平台时间, 记录成逃避潜伏期。如大鼠在 2 min 内无法找到平台, 则引导大鼠至平台上, 并停留 15 s, 并将该只大鼠的逃避潜伏期记录为 120 s。每天选取不同入水点, 3 次/d, 将所有记录的逃避潜伏期取平均值。3) 空间探索实验: 步骤结束后将池内的平台拆除, 将大鼠头部背对平台放入原先平台所在象限对侧象限, 观察 120 s, 记录大鼠游过原平台象限区域的次数。

1.2.3.2 HE 染色观察海马病理结构改变 干预结束后从各组随机选取 3 只大鼠, 充分麻醉后灌流 4% 多聚甲醛溶液, 随后快速取出脑组织后分离出海马, 并随机置于 4% 多聚甲醛溶液中。将标本置于包埋盒中, 用流水充分去除固定液, 持续 30 min。用 70% 乙醇 60 min-80% 乙醇 120 min-90% 乙醇 60 min-95% 乙醇 10 min-无水乙醇 I 120 min-无水乙醇 II 120 min 进行脱水后将样本置于二甲苯 I 20 min-二甲苯 II 20 min 进行标本透明, 随后将透明的样本置于 55 °C 蜡 I 60 min-蜡 II 60 min 中进行包埋, 修块, 切片 (厚度 5 μ m), 捞片至载玻片后放置于 45 °C 恒温箱中烘干。染色前将样本玻片置于烤片机上烤片 30 min, 在二甲苯 I 20 min-二甲苯 20 min 进行脱蜡, 再用梯度乙醇复水, 用苏木素染色 5 min 后流动水冲洗 1 min, 再用 1% 盐酸乙醇分化 3 s, 流动水冲洗 1 min, 用事先配置好的 0.01 mol/L PBS 溶液返蓝 1 min, 流动水冲洗 1 min, 在脱水、透明, 封片, 随后将玻片置于光学显微镜下观察并拍照。

1.2.3.3 Tunel 染色 取材及制片过程同 1.2.3.2, 按照 Tunel 试剂盒操作步骤对各组大鼠海马组织神经元细胞凋亡情况进行检测, DAPI 染色后呈现染色荧光的代表细胞核, 绿色荧光代表凋亡神经元细胞, 在激光共聚焦下显色并拍照, 每个脑片选取 5 个观察视野, 将所得结果用 Image. ProPlus 图像分析系统进行处理。凋亡细胞率 = (绿色荧光的凋亡细胞数/总细胞数) $\times 100\%$ 。

1.2.3.4 Western blotting 检测海马组织 PI3K、AKT、p-AKT、Bcl-2、Bax 蛋白表达水平的变化 每组随机抽取 3 只大鼠。全麻后取出海马组织,切成约 100 mg,加 1 mL 蛋白裂解液,室温放置 30 min,4 ℃,15 000 r/min 离心 5 min,取上清液备用。取 25 μL,用 BCA 法测定样品的蛋白质浓度,按样品缓冲液比例=4:1 将样品均匀混合,在 100 ℃水浴中加热变性 7 min,然后迅速置于冰上冷却。储存在 -20 ℃冰箱内备用。然后,根据所计算的样品量,将样品添加到预先制备的 SDS-PAGE 凝胶孔中,电泳,将目标蛋白膜转移到 PVDF 膜上,然后用封闭溶液密封 PVDF 膜,密封后,将 PVDF 膜在 TBS 中漂洗 3 次,进行 5 min/次后,以 1:500 比例稀释 β-actin、PI3K、Akt、p-Akt、Bcl-2、Bax、4 ℃,用一抗稀释液孵育过夜,在 TBS 中冲洗 3 次,每次 5 min 后,在室温下孵育标有碱性磷酸酶(用二级抗体稀释液稀释 1:2 000)的山羊抗兔 IgG 1 h,然后然后用 TBS 冲洗 3 次,5 min/次,然后将 ECL 显影剂滴入 PVDF 膜中进行显影,并用计算机扫描图像,并用 BIO RAD 图像软件(BioRad, Model Gel Doc 2000,美国)进行分析和处理。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计分析。数据采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,符合正态分布的用配对 *t* 检验,不符合正态分布的用秩和检验;多组计量资料采用单因素方差分析,方差齐用 LSD 法检验,不齐则用 Tamhane's 法检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠学习记忆行为学改变 模型组及涤痰汤组大鼠逃避潜伏期较正常对照组延长(*P* < 0.05),穿越平台次数减少(*P* < 0.05),其中涤痰汤组明显较模型组改善(*P* < 0.05)。见表 1、图 1。

2.2 各组大鼠海马组织神经元凋亡率比较 模型组及涤痰汤组大鼠神经元凋亡率明显高于正常对照组(*P* < 0.05),其中涤痰汤组明显较模型组降低(*P* < 0.05)。见表 2、图 2。

2.3 HE 染色结果 HE 染色提示正常对照组大鼠海马组织结构形态正常,模型组及涤痰汤组大鼠海马组织均出现明显结构破坏,细胞排列错乱,神经元细胞出现明显变形肿胀,其中涤痰汤组海马结构较模型组改善。见图 3。

2.4 各组大鼠 PI3K-AKT 信号通路标志性蛋白表达情况 Western blotting 结果显示,模型组及涤痰汤组大鼠海马组织 PI3K、p-AKT、Bcl-2 蛋白水平较正常对照组降低(*P* < 0.05),Bax 较正常对照组升高(*P* < 0.05)其中涤痰汤组较模型组改善(*P* < 0.05)。见表 4、图 4。

表 1 各组大鼠学习记忆行为学结果比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	逃避潜伏期(s)	穿越平台次数(次)
正常对照组		
造模前	12.22 ± 3.15	5.28 ± 1.36
干预后	12.19 ± 3.18	5.35 ± 1.34
模型组		
造模前	12.25 ± 3.06	5.19 ± 1.29
干预后	68.29 ± 7.14 *	1.87 ± 0.32 *
涤痰汤组		
造模前	12.18 ± 3.14	5.18 ± 1.27
干预后	44.12 ± 5.02 *△	3.18 ± 1.01 *△

注:与正常对照组同期比较,**P* < 0.05,与模型组同期比较,△*P* < 0.05

表 2 各组凋亡率比较($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	凋亡率
正常对照组	0.08 ± 0.015
模型组	4.68 ± 0.22
涤痰汤组	1.62 ± 0.12 *

注:与模型组同期比较,**P* < 0.05

表 4 各组大鼠 PI3K-AKT 通路各蛋白指标的
表达变化($\bar{x} \pm s$)

组别	PI3K/β-actin	p-AKT/AKT	Bcl2-/Bax
正常对照组	3.41 ± 1.11	2.76 ± 0.77	3.25 ± 0.36
模型组	0.59 ± 0.21 *	1.22 ± 0.21 *	1.02 ± 0.12 *
涤痰汤组	1.895 ± 0.95 *△	2.19 ± 0.73 *△	2.36 ± 0.23 *△

注:与正常对照组同期比较,**P* < 0.05,与模型组同期比较,△*P* < 0.05

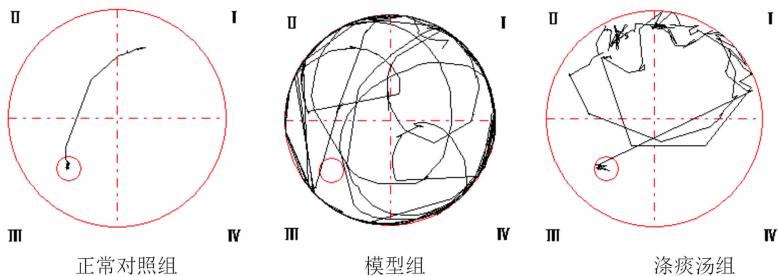


图 1 各组大鼠水迷宫轨迹图

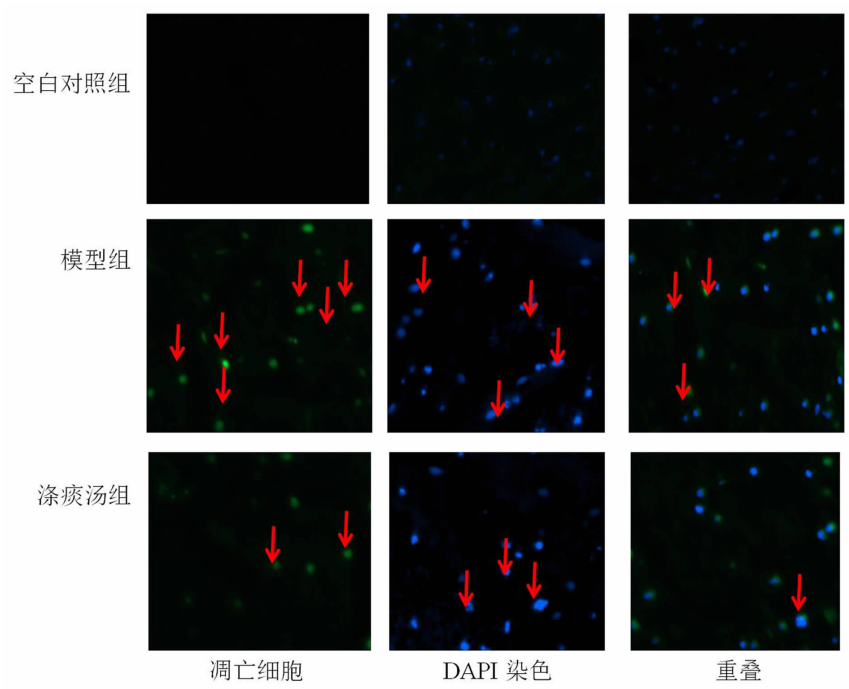


图 2 各组 Tunnell 染色结果

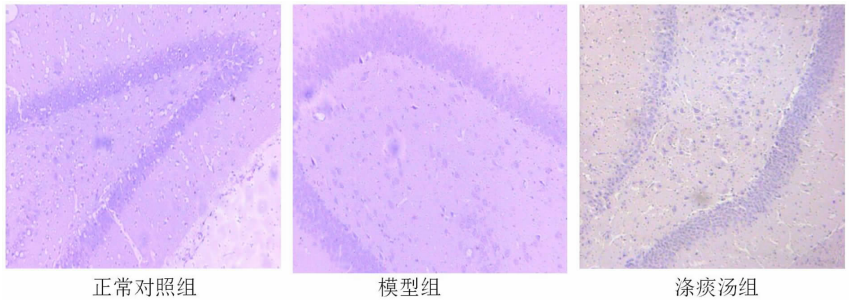


图 3 3 组大鼠海马组织 HE 染色比较(×200)

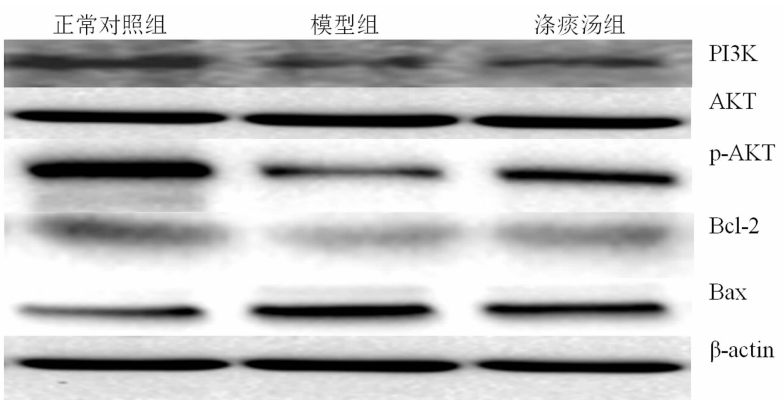


图 4 各组大鼠 PI3K-AKT 信号通路蛋白的表达水平

3 讨论

糖尿病致认知功能主要表现为学习力、记忆力、执行力、计算力、理解力等减退,严重影响患者的日常生活自理能力。不同糖尿病患者伴发认知障碍临床症状虽然表现各异,但学习记忆能力下降为核心症状^[7]。本研究利用 Morris 水迷宫检测糖尿病模型大鼠的学习记忆能力,结果显示接受造模的大鼠

逃避潜伏期较正常对照组延长,穿越平台次数减少,这提示糖尿病确导致大鼠学习记忆受损。我们进一步 HE 染色检测糖尿病模型大鼠海马组织的病理结构时发现与正常对照组大鼠比较,糖尿病模型大鼠海马组织出现明显结构破坏,细胞排列错乱,神经元细胞出现明显变形肿胀,这提示糖尿病致认知障碍与海马结构变化息息相关,这与诸多文献研究结果

一致^[8-10]。

早在宋代名著《圣济总录》中既有记载：“消渴日久，健忘怔忡”；《兰室秘藏》中亦提及：“消渴久则，…喜怒善忘”，这均说明糖尿病是引起认知能力受损的重要原因。古籍并无“糖尿病伴认知障碍”的病名，后世医家根据其临床表现将其归属于“健忘”“善忘”“呆病”等范畴，但其病因与其他原因引起的“呆病”不同，消渴病是该病明确的病因，故又将其称之为“消渴病兼证呆症”。而对于此病的治疗早在明代既有记载，张景岳在《景岳全书·杂证谟》中描述：“痴呆证，凡平素无痰…或以不遂…或疑贰…而兼致痴呆…其证则千奇万怪…”；《辨证录》中亦有记载：“治呆无奇法，治痰即治呆”。现代临床基于“痰邪致病”理论用涤痰汤有效治疗健忘、痴呆等神志相关性疾^[11-13]。涤痰汤首载于明代《奇效良方》，具有涤痰开窍的功效，方中人参、茯苓健脾益气，气旺痰消杜生痰之源，法半夏燥湿化痰，制南星祛风痰而止痉，可助半夏燥湿化痰之功，枳壳、橘红行气，使气顺则痰消，竹茹可清热化痰，甘草调和诸药为使药，全方共奏益气化痰、清浊开窍之功。本研究发现涤痰汤提高了糖尿病模型大鼠学习记忆能力，同时明显改善了模型鼠海马组织病理结构，这提示海马是涤痰汤有效改善糖尿病后认知障碍的靶器官。

在对涤痰汤作用机制研究中我们对 PI3K-AKT 信号通路的标志性蛋白进行检测，随着研究的不断深入，学者^[14-15]认为神经元凋亡程序的异常改变与糖尿病伴认知障碍的关系密切，而 PI3K-AKT 信号通路是凋亡相关的经典通路，PI3K 是该通路重要因子，在某种因素刺激下 PI3K 激活，随之诱发细胞膜上肌醇发生磷酸化^[16]，进一步诱发其下游第二信使 PIP3 的形成，并随之结合 Akt，并诱导其构象产生变化后出现核位移，诱发 AKT 磷酸化而生成 p-AKT^[17-18]，启动神经元细胞的凋亡程序。Bcl-2 与 Bax 与神经元细胞凋亡息息相关，二者在凋亡程序中发挥的作用相反，当 Bcl-2 占据优势时主要表现为抗凋亡，反之 Bax 占优势时发挥促凋亡效应^[19]。因此 Bcl-2 与 Bax 水平直接决定神经元细胞凋亡的走向。结果显示模型组及涤痰汤组大鼠海马组织 PI3K、p-AKT、Bcl-2 蛋白水平较正常对照组降低，Bax 较正常对照组升高，其中涤痰汤组较模型组改善。这一结果提示涤痰汤的确引起了 PI3K-AKT 信号通路的标志性蛋白表达的改变，其作用机制确与 PI3K/AKT 信号通路介导的细胞异常凋亡

有关。

参考文献

- [1] 吕耀成. 加味涤痰汤联合多奈哌齐治疗血管性痴呆痰浊蒙窍证对认知功能及日常生活能力的影响[J]. 实用中医药杂志, 2019, 35(2): 175-176.
- [2] 魏巍, 陆媛. 糖尿病相关治疗对认知功能影响的研究进展[J]. 中国全科医学, 2019, 3(9): 1-6.
- [3] 王飞, 罗剑锋, 丁珂, 等. 糖尿病对老年人总体认知功能水平及各认知领域的影响[J]. 中国临床神经科学, 2019, 27(1): 29-38.
- [4] 郑静峡. 自拟补肾涤痰开窍汤治疗血管性痴呆 36 例[J]. 实用中医内科杂志, 2005, 19(2): 135-135.
- [5] 陈岩. 礞石涤痰汤联合西药治疗精神分裂症临床观察[J]. 光明中医, 2018, 33(21): 3213-3215.
- [6] 明淑萍. 涤痰汤对糖尿病认知功能障碍大鼠干预作用及其机制的研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2018.
- [7] Candeias E, Sebastião I, Cardoso S, et al. Brain GLP-1/IGF-1 Signaling and Autophagy Mediate Exendin-4 Protection Against Apoptosis in Type 2 Diabetic Rats[J]. Mol Neurobiol, 2018, 55(5): 4030-4050.
- [8] 张毅, 张学英, 习玲, 等. 老年 2 型糖尿病合并轻度认知功能障碍患者的海马磁共振体积及波谱的研究[J]. 山西医药杂志, 2018, 47(19): 2309-2311.
- [9] 张红蕊, 王耕银, 崔昌萌, 等. 川陈皮素对糖尿病大鼠认知功能障碍的影响[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(18): 4516-4519.
- [10] 赵宇昊. 在 STZ 糖尿病大鼠模型中, 长非编码 RNA H19 通过 Wnt 信号传导通路诱导海马神经元凋亡的相关研究[D]. 长春: 吉林大学, 2018.
- [11] 聂惠琳, 姚欣艳. 国医大师熊继柏教授从痰论治痫病临床经验[J]. 湖南中医药大学学报, 2018, 38(12): 1363-1365.
- [12] 刘飞. 桃红四物汤合涤痰汤加减治疗癫痫的疗效[J]. 临床医药文献(连续型电子期刊), 2018, 5(86): 185.
- [13] 谢辉. 加味涤痰汤治疗缺血性脑卒中后轻度认知障碍 100 例[J]. 实用中医药杂志, 2018, 34(2): 174-175.
- [14] 王耕银. PI3K/AKT/GSK-3 β 通路在莱菔硫烷调控糖尿病大鼠认知功能减退中的作用[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2017.
- [15] 袁有才. 新加葛根芩连汤对糖尿病认知障碍大鼠海马微血管损伤及 PI3K/AKT/CREB 信号通路的作用机制研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2015.
- [16] 陈梦月, 陈伟东, 柳怡敏, 等. 紫草素通过 PI3K/Akt 通路抑制氧糖剥夺诱导的大鼠原代皮层神经元凋亡[J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(1): 106-111.
- [17] 赖文芳, 洪海棉, 张小琴, 等. 红景天苷通过激活 PI3K/AKT/NRF2 通路减轻 MCAO 大鼠的神经细胞凋亡[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(5): 1883-1886.
- [18] 李秀坤, 黄英华. 基于 PI3K/Akt 信号转导通路探讨电针足三里、曲池对脑缺血再灌注大鼠神经细胞凋亡的影响[J]. 重庆医学, 2016, 45(3): 303-306.
- [19] Fang Z, Ning J, Xiong C, et al. Effects of Electroacupuncture at Head Points on the Function of Cerebral Motor Areas in Stroke Patients: A PET Study[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2012, 2012: 902413.

(2019-03-11 收稿 责任编辑: 王明)