

知母-黄柏药对有效部位群改善2型糖尿病大鼠认知功能障碍的药效及机制研究

刘 静, 党院霞, 高 英, 周欣欣, 李卫民*

广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

摘要: **目的** 研究知母-黄柏药对有效部位群通过磷脂酰肌醇-3 激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (PKB/Akt) 通路改善 2 型糖尿病模型大鼠认知功能障碍的药效及作用机制。**方法** 50 只雄性 SD 大鼠随机分为 5 组, 每组 10 只, 分别为对照组、模型组、知母-黄柏药对有效部位群高剂量 (ZBH, 2.0 g/kg) 和低剂量 (ZBL, 1.0 g/kg) 组、盐酸美金刚 (MHT, 1.0 mg/kg) 组; 采用 ip 链脲佐菌素 (STZ) 联合喂食高脂饲料的方法制备 2 型糖尿病大鼠模型; 造模成功后各组大鼠开始 ig 给药, 连续给药 20 周, 分别在给药 8、16 周时测定大鼠血浆中 β 淀粉样蛋白 1-42 ($A\beta_{1-42}$) 水平, 并结合 Barnes 迷宫、Morris 水迷宫法检测大鼠的认知能力; 给药 20 周后, 取大鼠胰腺、海马组织进行形态学观察; qRT-PCR 检测 PI3K、Akt、Bcl-2 基因在大鼠脑组织中的表达。**结果** 给药 8、16 周时, 与对照组相比, 模型组大鼠血浆中 $A\beta_{1-42}$ 蛋白水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 与模型组相比, MHT、ZBH 组 $A\beta_{1-42}$ 蛋白水平均降低 ($P < 0.05$); 行为学检测结果显示, 与模型组相比, 各给药组均能不同程度改善大鼠记忆能力 ($P < 0.05$ 、 0.01); 给药 20 周, 大鼠海马 CA1 区病理结果显示, 对照组大鼠海马区神经元排列整齐、形态规则、着色均匀。模型组大鼠大量神经元细胞核深染、固缩, 神经元细胞排列紊乱, 部分细胞被小胶质细胞代替。与模型组相比, ZBH、ZBL 可有效改善大鼠海马组织神经元形态及细胞排列形态, 修复神经损伤; qRT-PCR 结果显示, 与对照组相比, 模型组大鼠脑组织 PI3K、Akt mRNA 表达有一定程度的降低, 抗凋亡基因 Bcl-2 mRNA 表达减弱 ($P < 0.05$), MHT、ZBH 均能不同程度上调 PI3K、Akt、Bcl-2 mRNA 的表达 ($P < 0.05$ 、 0.01)。**结论** 知母-黄柏药对有效部位群能明显降低 $A\beta_{1-42}$ 蛋白水平, 上调 PI3K、Akt mRNA 的水平, 对海马神经元具有修复和保护作用, 说明知母-黄柏药对有效部位群可能通过调节 PI3K/Akt 通路而实现对 2 型糖尿病大鼠认知功能障碍的改善。

关键词: 知母-黄柏药对; 有效部位群; 2 型糖尿病; 认知功能障碍; β 淀粉样蛋白 1-42; PI3K/Akt 信号通路; Bcl-2

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)19-4037-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.19.021

Effects and mechanism of *Anemarrhenae Rhizoma-Phellodendri Chinensis Cortex* medicine effective parts to improve cognitive impairment in type 2 diabetic rats

LIU Jing, DANG Yuan-xia, GAO Ying, ZHOU Xin-xin, LI Wei-min

School of Chinese Herbal Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: **Objective** To study the effects of *Anemarrhenae Rhizoma-Phellodendri Chinensis Cortex* medicine effective parts on phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway and explore its mechanism of action to improve brain cognitive of type 2 diabetes rats. **Methods** A total of 50 male SPF SD rats, divided into five groups with 10 for each group, named as control group, model group, high/low dosage of *Anemarrhenae Rhizoma-Phellodendri Chinensis Cortex* medicine effective parts (ZBH and ZBL) group, and Ebixa (MHT) treatment group; The rats were immunized with ip of streptozotocin (STZ) jointly fed high-fat diet for three weeks. Then the rats were continuously gavaged with ZBH, ZBL, and MHT for 20 weeks, the serum $A\beta_{1-42}$ levels were determined in 8th and 16th week respectively, the changes of the cognitive impairment were analyzed, combined with Barnes maze and Morris water maze to detect the cognitive ability of each group rats; At the end of 20 weeks of administration, dissecting and preserving the rat pancreatic tissue, the hippocampus to make into routine pathological sections and brain tissue pathology morphology inspection and PI3K, Akt, and Bcl-2 mRNA expression by fluorescence quantitative PCR method detection. **Results** After treatment for 8 weeks and 16 weeks, compared with control group, $A\beta_{1-42}$ levels of model group were significantly increased

收稿日期: 2017-01-17

作者简介: 刘 静 (1991—), 女, 在读硕士。Tel: 13535464764 E-mail: 13535464764@139.com

*通信作者 李卫民 (1954—), 男, 教授, 博士生导师。Tel: (020)39358290 E-mail: LiWeimin@gzucm.edu.cn

($P < 0.05, 0.01$); Administration 20 weeks, compared with control group, pathological section results showed normal hippocampus cells arranged in neat rows, morphological rules, and color is very even. DM models of hippocampal tissue cells arranged scattered through the administration significantly after repair. Compared with model group, ZBH and ZBL could effectively improve the form of neurons and cell arrangement of rat's hippocampus, repairing nerve injury; Compared with control group, PI3K and Akt mRNA expression of hippocampal tissue of model group rats decreased, Bcl-2 mRNA expression was abate ($P < 0.05$). After delivery, MHT and ZBH group could significantly improve the level of PI3K, Akt, and Bcl-2 mRNA expression ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** *Anemarrhenae Rhizoma-Phellodendri Chinensis Cortex* medicine effective parts can significantly reduce the accumulation of $A\beta_{1-42}$ protein, and decreased the expression of PI3K and Akt, indicating that the effects of improvement of cognitive impairment in type 2 diabetic rats may be achieved through regulation of PI3K/Akt pathway.

Key words: drug couple of *Anemarrhenae Rhizoma-Phellodendri Chinensis Cortex*; effective parts group; type 2 diabetes; cognitive impairment; $A\beta_{1-42}$; PI3K/Akt signaling pathway; Bcl-2

糖尿病相关认知能力下降 (diabetes-associated cognitive decline, DACD) 是指轻至中度的认知功能障碍状态, 特别是指精神运动性迟缓和思维灵活性下降^[1-2], 而轻度认知障碍 (mild cognitive impairment, MCI) 是正常衰老到阿尔茨海默病 (AD) 的过渡阶段, 存在 MCI 的患者也是痴呆的高危人群^[3]。研究表明, 糖尿病患者中有 60%~70% 存在 MCI 和痴呆, 2 型糖尿病成为认知功能减退的 1 个危险因素^[4]。知母-黄柏是一种常用的经典药对, 最早出自金·李杲的《兰室秘藏》, 方名通关丸, 亦名滋肾丸^[5]。其中, 川黄柏 *Phellodendri Chinensis Cortex* 为芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid 的干燥树皮, 主要有效成分为生物碱类; 知母 *Anemarrhenae Rhizoma* 源于百合科多年生草本植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bunge 的干燥根茎, 主要有效成分为皂苷类; 现代药理研究表明, 知母所含的皂苷类、黄酮类及多糖类等成分有显著的降血糖、调血脂、抗炎、改善老年痴呆引起的记忆退化等作用^[6]; 而黄柏的主要有效物质为总生物碱, 又以小檗碱为主, 具有明显的降血糖、调血脂、抗炎及免疫调节等作用, 在改善糖尿病患者周围神经病变的神经传导速度等方面有积极作用^[7-8]。本实验研究了知母-黄柏药对有效部位群通过调节 PI3K/Akt 通路改善 2 型糖尿病模型大鼠认知障碍的药效及作用机制, 为知母-黄柏药对的临床应用提供参考, 也为糖尿病伴认知障碍的临床治疗提供一定的研究思路。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性健康 SD 大鼠 50 只, 体质量 (200±20) g, 购于广东省医学实验动物中心, 动物合格证号 SCXK (粤) 2013-0002。饲养于广东药科大学实

验动物中心 SPF 级动物实验室, 许可证号 SYXK (粤) 2012-0125。

1.2 仪器

RT-2100C 自动酶标仪、HITACHI CR22G 型高速低温离心机 (日本 SANYO 公司); BX51 型光学显微 (日本奥林巴斯株式会社); NANODROP 2000 分光光度计 (美国 Thermo 公司); MyGene serles Peltier Thermal Cycler 分析仪 (杭州朗基科技有限公司); CFX96™ 型 Real-Time PCR 仪 (美国伯乐公司)。

1.3 药品与试剂

知母-黄柏药对有效部位群由河北晨光生物科技集团邯郸有限公司提供, 经高效液相色谱检测含盐酸小檗碱 20.65%、黄柏碱 2.08%、知母皂苷 BII 12.74%、芒果苷 2.79%; 紫外检测总皂苷量为 47.71%, 总生物碱量为 24.93%; 盐酸美金刚片 (批号 584087, 丹麦灵北药厂); 链脲佐菌素 (STZ, 批号 040M1357, 美国 Sigma 公司); β 淀粉样蛋白 1-42 ($A\beta_{1-42}$) ELISA 检测试剂盒为武汉华美公司提供; 总 RNA Trizol 提取试剂盒、逆转录试剂盒、扩增试剂盒均购于日本 TaKaRa 公司; 阿拉伯树胶 (天津大茂化学试剂有限公司)。

1.4 饲料

高脂饲料配方: 蔗糖 20%、猪油 15%、胆固醇 1.2%、胆酸钠 0.2%、酪蛋白 10%、磷酸氢钙 0.6%、石粉 0.4%、预混料 0.4%、基础饲料 52.2%。由广东省医学实验动物中心加工, 饲料合格证号 SCXK (粤) 2013-0002; 基础饲料, SPF 级, 由广东省医学实验动物中心提供。

2 方法

2.1 分组、模型复制及给药

采用 ip STZ 联合喂食高脂饲料方法制备 2 型糖尿病大鼠模型^[9-10]。取健康雄性 SD 大鼠, 适应性饲

养 7 d, 禁食 14 h, 乙醚麻醉, 眼底静脉丛取血, 测定空腹血糖 (Glu) 作为基础血糖水平。50 只雄性 SD 大鼠随机分为 5 组, 每组 10 只, 分别为对照组、模型组、知母-黄柏药对有效部位群高剂量 (ZBH) 和低剂量 (ZBL) 组、盐酸美金刚 (MHT) 组。对照组大鼠喂食基础饲料, 其余大鼠在取血 4 d 后, 禁食 14 h, 称定质量, ip STZ 37 mg/kg (对照组 ip 等体积缓冲盐溶液) 制备高血糖模型, 在 30 min 内注射完毕。造模期间大鼠用基础饲料喂养。ip STZ 3 周后, 眼底静脉丛取血测定大鼠空腹血糖 (采血前禁食 14 h), 大鼠空腹血糖 ≥ 7.6 mmol/L, 并出现多饮、多尿症状为造模成功。除对照组外, 模型组和各给药组开始喂饲高脂饲料, 各给药组开始 ig 给药, 连续给药 20 周。根据《中国药典》2015 年版, 按临床生药量计, 以人体质量 (60 kg) 折算大鼠的临床等效剂量分别为 ZBH 2.0 g/kg、ZBL 1.0 g/kg, MHT 1.0 mg/kg, 溶媒均为 5.0 g/L 阿拉伯树胶溶液, 对照组和模型组小鼠 ig 溶媒 10 mL/kg。

2.2 样本采集与指标检测

实验中由于操作不当造成每组有个别大鼠死亡或精神状态较差, 因此每组选取 6 只大鼠进行指标检测。

2.2.1 ELISA 法检测大鼠血浆中 $A\beta_{1-42}$ 蛋白水平 分别于给药第 8、16 周, 大鼠禁食 12 h 后, 乙醚麻醉, 眼底静脉丛取血, 血样分装于加有肝素钠的 EP 管中, 4 °C、3 000 r/min, 离心 15 min, 分离血浆, 用于 $A\beta_{1-42}$ 蛋白的测定。

2.2.2 Barnes 迷宫和 Morris 水迷宫实验评价大鼠空间学习、记忆能力 分别于给药第 8、16 周进行 Barnes 迷宫实验, 记录各组大鼠寻找目标洞的潜伏期、逃避期、错误次数; 给药 20 周进行 Morris 水迷宫实验, 记录各组大鼠寻找目标平台的潜伏期及在目标区域的穿越次数, 综合评价各组大鼠对于目标区域的空间记忆能力。

2.2.3 苏木精-伊红 (HE) 染色观察大鼠胰腺组织和脑组织海马 CA1 区形态学变化 给药第 20 周, 禁食 12 h 后, 水合氯醛麻醉, 大鼠腹主动脉采血 3~5 mL, 4 °C、3 000 r/min, 离心 15 min, 采集上层血清, -80 °C 保存, 用于血液指标检测。取大鼠胰腺组织, 10% 多聚甲醛固定, 采血后迅速剪开大鼠头部毛及皮肤, 撬开颅骨, 剥离硬、软脑膜, 切断各对出颅神经根丝, 游离并取出全脑。取出大脑, 用解剖刀沿正中矢状缝切开成 2 个半球, 其中一半 10% 多聚甲醛固定, HE 染色, 显微镜下观察脑组织

海马 CA1 区形态学变化。

2.2.4 qRT-PCR 检测 PI3K、Akt、Bcl-2 mRNA 表达 用 Trizol 提取脑组织总 RNA, 用微量紫外分光光度计测定其浓度及纯度, 然后逆转录成 cDNA。所用引物分别为 GADPH: 上游 5'-TGATTCTAC CCACGGCA-AGT-3', 下游 5'-AGCATCACCCCATTTGATGT-3'; PI3K: 上游 5'-TGTCTGCGTTAGGGCTTACC-3', 下游 5'-CCCGGATGTATTCAATGTCC-3'; Akt: 上游 5'-GAACGACGTAGCCATTGTGA-3', 下游 5'-GCCGTTCCTTGTAGCCAATA-3'; Bcl-2: 上游 5'-AGGATTGTGGCCTTCTTTGA-3', 下游 5'-CAGATGCCGGTTCAGGTACT-3'。反应体系为 cDNA 2 μ L, 上下游引物各 1 μ L, SYBR® Premix Ex TaqII (Tli RNaseH Plus) 12.5 μ L, 无 RNase 水 8.5 μ L; 反应步骤为 95 °C、30 s; 95 °C、5 s, 55 °C、30 s, 72 °C、1 min, 39 次循环; 72 °C、10 min。结果用 C_t 值表示, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对目的基因进行相对定量分析。

2.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件, 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 若方差齐, 两组间比较用 LSD- t 检验法; 若方差不齐, 两组间比较用 Bonferroni's T3 检验法。

3 结果与分析

3.1 知母-黄柏药对有效部位群对糖尿病大鼠血浆中 $A\beta_{1-42}$ 蛋白水平的影响

$A\beta_{1-42}$ 蛋白的表达量是痴呆的重要评价指标, 与给药第 8 周相比, 给药第 16 周, 各组大鼠血浆中 $A\beta_{1-42}$ 蛋白量均明显上升, 说明 $A\beta_{1-42}$ 蛋白在体内有缓慢积累的过程。与模型组相比, 给药 8 周和 16 周时, MHT、ZBH 组大鼠血浆中 $A\beta_{1-42}$ 蛋白的积聚有不同程度的改善 ($P < 0.05$ 、 0.01)。ZBH 组下调 $A\beta_{1-42}$ 蛋白表达的效果优于 ZBL 组, 结果见表 1。

表 1 知母-黄柏药对有效部位群对糖尿病大鼠血浆中 $A\beta_{1-42}$ 蛋白水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 1 Effects of the *Anemarrhenae Rhizoma-Phellodendri Chinensis* Cortex medicine effective parts on expressions of $A\beta_{1-42}$ protein in plasma of diabetic rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	$A\beta_{1-42}/(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$	
	第 8 周	第 16 周
对照	11.511 $\pm$ 2.145	15.474 $\pm$ 0.159
模型	14.466 $\pm$ 1.644*	19.636 $\pm$ 0.450**
MHT	12.654 $\pm$ 1.502 [#]	16.348 $\pm$ 0.313 [#]
ZBH	13.550 $\pm$ 1.389	16.669 $\pm$ 0.515 [#]
ZBL	13.913 $\pm$ 1.229	17.908 $\pm$ 0.696

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group

3.2 知母-黄柏药对有效部位群对糖尿病大鼠行为学的影响

Barnes 迷宫实验主要考察大鼠的记忆能力, 其中, 潜伏期主要考察大鼠对方向和位置的记忆能力; 逃避期主要考察大鼠空间定位能力、定位的准确性和时效性, 错误次数越多, 说明探寻能力越差, 记忆力弱。给药第 8、16 周, 行为学结果 (表 2) 显示, 与对照组相比, 模型组大鼠的潜伏期、逃避期均显著延长, 错误次数均显著增加 ($P<0.05$ 、 0.01); 与模型组相比, ZBH 组大鼠在给药第 16 周时潜伏期和逃避期均显著缩短 ($P<0.05$ 、 0.01), 给药第 8、16 周时错误次数显著减少 ($P<0.05$)。经过连续给药, ZBH 改善大鼠记忆能力的作用优于 ZBL。

Morris 水迷宫实验是目前较为客观的评价实验动物学习、记忆能力的方法。通过 Morris 水迷宫检测空间、定位记忆能力, 大鼠能够学会在水箱内定

向游泳并有效找到隐藏在水下的逃避平台。通过记录大鼠到达目标平台的潜伏期和穿越目标区域的次数, 综合评价实验动物的记忆、学习水平。其中, 定位航行实验主要考察实验大鼠的定向记忆能力, 考察时间为 4 d; 空间探索实验分为 2 个阶段, 第一阶段为初期测试, 经过 1 周时间之后, 进行第二阶段测试, 评估大鼠的长期记忆能力。

由表 3 可知, 给药 20 周后, 经过连续 4 d 的水迷宫定位航行训练, 与对照组相比, 模型组大鼠达目标平台的潜伏期显著延长 ($P<0.01$), 提示实验性糖尿病认知障碍模型诱导成功; 与模型组相比, MHT、ZBH 具有明显改善模型大鼠认知、记忆的作用 ($P<0.05$ 、 0.01); 由表 4 可知, 在连续 2 个阶段的空间探索实验中, 与对照组相比, 模型组到达平台的潜伏期显著延长 ($P<0.05$ 、 0.01); 与模型组相比, ZBH 组大鼠在目标区域的穿越次数显著增加

表 2 Barnes 迷宫实验结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 2 Results of Barnes maze test ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	第 8 周			第 16 周		
	逃避期/s	潜伏期/s	错误次数	逃避期/s	潜伏期/s	错误次数
对照	11.500±1.669	22.000±1.405	1.750±0.163	14.187±0.107	23.310±1.475	1.125±0.125
模型	15.250±1.300*	32.188±1.085**	3.375±0.182*	22.063±1.256**	37.125±1.188**	2.438±0.175**
MHT	9.500±0.866 [#]	22.938±1.112 ^{##}	2.250±0.164	14.000±0.931 ^{##}	25.250±1.109 ^{##}	1.500±0.164 [#]
ZBH	13.250±1.497	29.313±2.322	2.125±0.125 [#]	15.375±0.778 [#]	27.063±1.515 ^{##}	1.750±0.134 [#]
ZBL	14.125±1.381	30.188±2.451	2.500±0.189	19.063±0.417	31.260±1.114 [#]	1.875±0.082

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$, 下同

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group, same as below

表 3 Morris 水迷宫定位航行实验结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 3 Results of positioning navigation experimental of Morris maze ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	第 1 天潜伏期/s	第 2 天潜伏期/s	第 3 天潜伏期/s	第 4 天潜伏期/s
对照	18.750±0.901	13.875±0.227	14.500±0.925	6.250±0.453
模型	28.750±1.556**	23.000±0.567**	23.500±0.732**	13.500±0.779**
MHT	22.250±1.129 ^{##}	17.125±0.811 ^{##}	16.375±0.822 ^{##}	7.000±0.462 ^{##}
ZBH	26.750±1.221 [#]	18.125±1.093 [#]	17.625±0.565 ^{##}	7.375±0.460 ^{##}
ZBL	28.250±1.146	18.625±1.463 [#]	19.750±0.940	9.875±0.350 [#]

表 4 Morris 水迷宫空间探索实验结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 4 Results of space exploration of Morris maze ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	第 1 阶段测试		第 2 阶段测试	
	潜伏期/s	穿越次数	潜伏期/s	穿越次数
对照	6.000±0.365	3.167±0.401	5.333±0.667	3.333±0.422
模型	10.833±0.792**	2.167±0.167*	8.333±0.803**	2.103±0.333*
MHT	7.000±0.931 [#]	2.667±0.210	6.167±0.401 [#]	3.167±0.167 [#]
ZBH	7.333±1.256 [#]	2.500±0.223	6.167±0.601 [#]	2.883±0.401 [#]
ZBL	8.333±1.667	2.167±0.307	6.333±0.803 [#]	2.667±0.558

($P<0.05$), 表明知母-黄柏药对有效部位群对大鼠认知障碍具一定程度的改善作用, 且高剂量优于低剂量。此外, 由表 3、4 可知, 随着行为学训练时间的延长, 各组大鼠寻找目标平台的潜伏期均呈现递减的趋势, 穿越次数出现递增的趋势, 尤其是各给药组变化趋势更明显 (每组大鼠随着训练次数的增加, 对水迷宫的目标区域的定位和方向感会逐渐形成惯性记忆, 相对于对照组, 模型组记忆过程较为缓慢)。

3.3 知母-黄柏药对有效部位群对糖尿病大鼠胰腺组织和脑组织海马 CA1 区神经元形态的影响

HE 染色分别对大鼠胰腺组织和脑组织中海马 CA1 区神经元进行观察。胰腺组织病理结果 (图 1) 显示, 对照组大鼠胰腺腺泡细胞均包膜完整, 胰岛团为圆形或卵圆形, 胞核、边界清晰; 模型组大鼠胰岛细胞排列紊乱, 胰岛细胞坏死明显, 局部炎性细胞灶性浸润伴胰岛细胞严重水肿, 部分细胞气球样变, 部分区域铁血黄素沉积及小叶内导管蛋白呈

管型; MHT、ZBH 组大鼠胰腺细胞轻度水肿, 细胞排列较模型组有序, 胰腺细胞坏死减轻, 少量细胞气球样变, 相对模型组有修复作用; ZBL 组改善作用不明显。大鼠海马 CA1 区神经元病理结果 (图 1) 显示, 对照组大鼠海马区神经元排列整齐, 形态规则, 着色均匀; 模型组大鼠海马区大量神经元细胞核深染、固缩, 细胞排列紊乱, 部分细胞被小胶质细胞代替; MHT 组大鼠海马区局部区域部分神经元细胞核深染、固缩, 同时可见少量小胶质细胞噬神经元现象。ZBH、ZBL 组大鼠海马区神经元数量丢失较模型组轻, 可见少量固缩状的坏死神经元。综合大鼠胰腺病理结果和海马 CA1 区神经元病理形态可以推断出, 糖尿病和阿尔茨海默病病理改变之间存在正相关, 胰岛细胞破坏最严重的模型组, 其大脑 CA1 区神经元的损伤程度也最大, 说明糖尿病的发生会伴随脑组织神经退化, 患糖尿病会增加罹患阿尔茨海默病的风险。

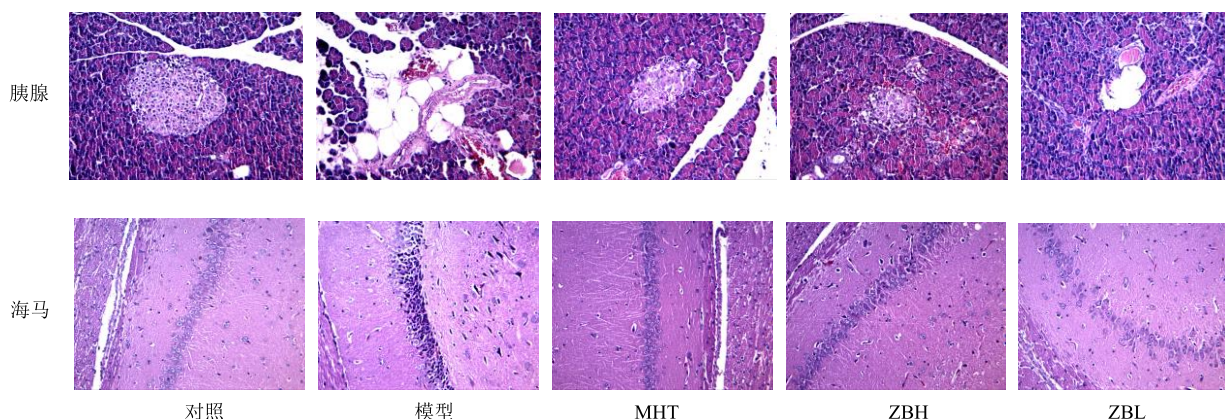


图 1 各组大鼠胰腺组织、海马组织 CA1 区 HE 染色结果 (×100)

Fig. 1 Results of HE staining of pancreatic tissue and CA1 area of hippocampal tissue of rats in each group (×100)

3.4 知母-黄柏药对有效部位群对糖尿病大鼠脑组织 PI3K、Akt 和 Bcl-2 mRNA 表达的影响

与对照组比较, 模型组大鼠脑组织中 PI3K mRNA 表达呈现下调趋势 (表 5), 而 Bcl-2 mRNA 表达明显下调 ($P<0.05$); 与模型组相比, MHT、ZBH 组大鼠 PI3K、Akt、Bcl-2 mRNA 的水平显著上调 ($P<0.05$ 、 0.01); ZBL 组大鼠对 Akt mRNA 表达上调不明显, 可上调 PI3K、Bcl-2 mRNA 的表达 ($P<0.05$), 表明知母-黄柏药对有效部位群可有效抑制细胞凋亡, 修复神经损伤, 有可能是通过激活 PI3K/Akt 途径实现的。

4 讨论

目前, 国内外对糖尿病周围神经病变研究报道

表 5 知母-黄柏药对有效部位群对糖尿病大鼠脑组织 PI3K、Akt 和 Bcl-2 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 5 Effects of *Anemarrhenae Rhizoma-Phellodendri Chinensis Cortex* medicine effective parts on expressions of PI3K, Akt, and Bcl-2 mRNA in brain tissue of diabetic rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	相对表达量		
	PI3K	Akt	Bcl-2
对照	1.005±0.051	0.158±0.009	1.357±0.065
模型	0.753±0.023	0.191±0.006	1.126±0.080*
MHT	1.852±0.235 [#]	0.383±0.024 ^{###}	1.673±0.087 ^{###}
ZBH	2.221±0.198 ^{###}	0.323±0.024 [#]	1.549±0.042 ^{###}
ZBL	1.750±0.150 [#]	0.237±0.015	1.382±0.069 [#]

较多,对糖尿病中枢神经系统损伤造成的糖尿病认知功能障碍或称为糖尿病脑病(diabetic encephalopathy, DE)的关注较少。糖尿病认知功能障碍的中医病机目前也缺乏统一认识,各执其说,主要有肾精亏损和气血不足为本,痰浊阻窍和气滞血瘀为标的本虚标实学说^[11]、“毒损脑络”学说^[12]以及以脑为轴心的“胰(脾)-脑-肾轴”学说^[13]等。糖尿病认知功能障碍主要的临床表现为学习能力下降,记忆力减退,语言、理解、判定等能力受影响,可伴有神情淡漠、表情呆滞、反应迟钝,严重者生活不能自理^[14],应归属中医学“消渴”合并“呆病”“健忘”“善忘”“痴证”“愚痴”“文痴”等范畴。古籍对“健忘”的病因病机分别从气运、外邪、气血、脏腑、虚实、情志、饮食、起居、误治等角度论述,体现了多层次、多因素和综合观,为个体化治疗提供理论基础。糖尿病认知功能障碍的病位在脑,脑居颅内,由髓汇集而成,髓海不足为其根本原因^[15],而肾为先天之根、封藏之本,藏精生髓。诚如《灵枢·经脉》篇所云:“人始生,先成精,精成而脑髓生”,说明肾具有藏精生髓充脑的功能。

综合糖尿病认知障碍中医学研究可以看出,其主要病机为肾精失养、痰瘀阻滞引起脑部失去正常滋养,引起大脑学习记忆障碍,最终导致痴呆。从中医角度出发,本课题研究的中药知母性寒,味苦、甘,入肾、肺、胃经,具有滋肾润燥、清热泻火功效;黄柏,性寒,味苦,入肾、膀胱、大肠经,有坚阴、清热燥湿、泻火解毒之效果,善退虚热。明代李时珍曾指出:“知母之辛苦寒凉,下则润肾燥而滋阴,上则清肺金泻火,乃二经气分药也”。黄柏则是肾经血分药,故二药必相须而行^[16],能够养脾胃、滋养肾精不足,同时能够利水消肿,在减少体内痰瘀阻滞的同时,促进脑髓生成,从而达到降糖、改善认知障碍的作用。

研究发现 PI3K/Akt 信号通路与脑缺血过程中的细胞凋亡密切相关。多种神经营养因子、缺血预处理和缺血后处理及中药都通过激活 PI3K/Akt 信号通路抑制细胞凋亡,发挥神经保护作用。PI3K 特异性地催化磷脂酰肌醇(phos-phatidylinositol, PI) 3 位羟基磷酸化,产生具有第二信使作用的肌醇脂物质,有多种细胞生物学调控作用^[17-18]。Akt 是 1 种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,因其与蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 和 PKC 有较高的同源性,亦被命名为蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB),

Akt 被 PI3K 磷酸化激活后调控细胞代谢、细胞周期调控、细胞生长凋亡等多种生物学过程^[19]。研究表明, A β 能直接损伤 PI3K/Akt 通路^[20-21],在 AD 患者海马检测到磷酸化 Akt (p-Akt) 水平下降^[22]。Jover-Mengual 等^[23]研究雌激素对全脑缺血后大鼠神经元保护作用时发现,全脑缺血后立即注射外源性雌激素,可以通过激活 PI3K/Akt 通路磷酸化下游 GSK-3 β 和 FOXO 3A 分子,抑制 caspase-3 活性而发挥抗凋亡作用,保护缺血敏感区海马 CA1 区神经元不受损害。Ishrat 等^[24]和 Fang 等^[25]研究发现, Bcl-2、Bax 在 AD 患者海马区均有免疫调节活性,其中 Bcl-2 在老年斑周围反应性胶质细胞中过度表达, Bax 则在老年斑中有免疫活性,参与老年斑形成的免疫反应和细胞凋亡过程,调节 Bcl-2 家族相关蛋白的表达能促进胆碱能神经元生长和减少 A β 沉积导致的神经元凋亡,证实 PI3K/Akt/Bcl-2 信号通路在改善神经细胞凋亡中发挥重要作用。

本实验通过诱导实验性大鼠糖尿病认知功能障碍模型,通过生化指标检测结合认知行为学实验、脑组织病理形态及荧光定量 PCR 法检测脑组织 PI3K、Akt、Bcl-2 mRNA 蛋白表达,多方面探索知母-黄柏药对有效部位群对于糖尿病性认知功能障碍的药效作用机制。其中,血液生化指标结果表明,知母-黄柏药对有效部位群可显著改善实验大鼠血浆淀粉样蛋白的水平($P<0.05$),有效抑制淀粉样蛋白的积聚,缓解糖尿病引发的实验大鼠脑部的病理改变;行为学实验结果表明,随着造模时间的延长,经连续给予知母-黄柏药对有效部位群 20 周,可明显改善模型大鼠的记忆力,有效缩短模型大鼠寻找目标洞或目标平台的时间($P<0.05$ 、 0.01);胰腺和海马 CA1 区 HE 染色结果显示,糖尿病和阿尔茨海默病病理改变之间存在正相关,胰岛细胞破坏最严重的模型组,其大脑 CA1 区神经元的损伤程度也最大,提示糖尿病的发生会伴随脑组织神经退化,患糖尿病会增加罹患阿尔茨海默病的风险,经过知母-黄柏药对有效部位群给药后,能在一定程度上修复和保护模型大鼠脑组织神经损伤;而脑组织 qRT-PCR 结果显示,知母-黄柏药对部位群对脑组织 PI3K、Akt、Bcl-2 mRNA 蛋白表达的水平均有不同程度的改善,提示知母-黄柏药对有效部位群改善糖尿病性认知障碍可能是通过调节 PI3K/Akt/Bcl-2 信号通路实现的。综上所述,本课题分别从传统中药遣方用药的理念和现代药理药效机制研究方法,

立足中医病机学、辨证论治、脏腑归经理念结合知母、黄柏及知母-黄柏药对的临床应用,探讨知母-黄柏药对有效部位群对于糖尿病性认知障碍的药效机制,结果显示知母-黄柏药对有效部位群具有降糖、改善认知障碍的作用,更深层次的机制还需要进一步的探索和研究。

参考文献

- [1] Mijnhout G S, Scheltens P, Diamant M, *et al.* Diabetic encephalopathy: A concept in need of a definition [J]. *Diabetologia*, 2006, 49(6): 1447-1448.
- [2] Whitmer R A. Type 2 diabetes and risk of cognitive impairment and dementia [J]. *Dementia*, 2007, 7(5): 373-380.
- [3] Biessels G J, Strachan M W, Visseren F L, *et al.* Dementia and cognitive decline in type 2 diabetes and prediabetic stages: Towards targeted interventions [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2014, 2(3): 246-255.
- [4] Gebel E, 易罗英. 大脑中的糖尿病 [J]. *糖尿病新世界*, 2012, 3(9): 72-74.
- [5] 李 峰, 贾彦竹. 黄柏的临床药理作用 [J]. *中医药临床杂志*, 2004, 16(2): 191.
- [6] Liu Z, Jin Y, Yao S Y, *et al.* Saponins from *Anemarrhena asphodeloides* Bge protect neurons from amyloid beta-protein fragment 25-35-induced apoptosis [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2006, 20(4): 295-304.
- [7] 刘 静, 李 艳, 辛永涛, 等. 知柏药对原料提取物对小鼠糖尿病周围神经病变的药效作用 [J]. *广州中医药大学学报*, 2016, 33(1): 103-109.
- [8] 潘龙瑞, 蓝星莲, 朱克刚, 等. 黄连素对糖尿病大鼠坐骨神经损伤的保护作用 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2010, 19(5): 534-536.
- [9] 魏占英, 沈 丽, 冯晓慧, 等. 高脂饲料喂养时间和STZ剂量对建立2型糖尿病大鼠模型的影响 [J]. *医学研究杂志*, 2014, 43(2): 42-46.
- [10] 殷成坤, 刘 燕, 李晓霞, 等. 高脂饮食联合STZ建立2型糖尿病大鼠模型稳定性观察 [J]. *川北医学院学报*, 2016, 31(2): 178-182.
- [11] 田国庆. 糖尿病脑病与消渴病兼证“呆症”及其中医治疗 [J]. *中国临床医生*, 2006, 34(5): 12-13.
- [12] 宋福印, 王永炎, 黄启福. 试论毒损脑络与糖尿病性脑病 [J]. *北京中医药大学学报*, 2000, 23(5): 7.
- [13] 岳仁宋, 王 帅, 陈 源, 等. 2型糖尿病认知功能障

碍的中医辨治 [J]. *新中医*, 2011, 43(6): 137-138.

- [14] 张 静, 知母提取物改善3型糖尿病作用机制初探, 硕士论文 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.
- [15] 陈文静, 黄小波. 2型糖尿病认知功能障碍中西医研究进展 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2012, 19(7): 106-110.
- [16] 袁 怡, 张跃明. 中医药治疗糖尿病脑病机理研究 [J]. *吉林中医药*, 2008, 8(12): 867-868.
- [17] Prasad S S, Russell M, Nowakowska M. Neuroprotection induced *in vitro* by ischemic preconditioning and postconditioning: Modulation of apoptosis and PI3K-Akt pathways [J]. *Mol Neurosci*, 2011, 43(3): 428-422.
- [18] Tiwari S K, Seth B, Agarwal S, *et al.* Ethosuximide induces hippocampal neurogenesis and reverses cognitive deficits in amyloid-beta toxin induced Alzheimer's rat model via PI3K/Akt/Wnt/beta-catenin pathway [J]. *Biol Chem*, 2015, 290(47): 28540-28558.
- [19] Peng B, Guo Q L, He Z J. Remote ischemic postconditioning protects the brain from global cerebral ischemia/reperfusion injury by up-regulating endothelial nitric oxide synthase through the PI3K/Akt pathway [J]. *Brain Res*, 2012, 14(45): 92-102.
- [20] Lindsay J, Esposti M D, Gilmore A P. Bcl-2 proteins and mitochondria specificity in membrane targeting for death [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 18(13): 532-539.
- [21] Bajwa N, Liao C, Nikolovska-Coleska Z. Inhibitors of the anti-apoptotic Bcl-2 proteins: A patent review [J]. *Expert Opin Ther Patents*, 2012, 22(1): 37-55.
- [22] Ghavamli S, Hashemi M, Ande S R, *et al.* Apoptosis and cancer: Mutations within caspase genes [J]. *Med Genet*, 2009, 46: 497-510.
- [23] Jover-Mengual T, Miyawaki T, Latuszeka A, *et al.* Acute estradiol protects CA 1 neurons from ischemia-induced apoptotic cell death via the PI3K/Akt pathway [J]. *Brain Res*, 2010, 19: 1-12.
- [24] Ishrat T, Sayeed I, Atif F, *et al.* Progesterone is neuroprotective against ischemic brain injury through its effects on the phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B signaling pathway [J]. *Neuroscience*, 2012, 2(10): 442-450.
- [25] Fang F, Li D, Pan H, *et al.* Luteolin inhibits apoptosis and improves cardiomyocyte contractile function through the PI3K/Akt pathway in simulated ischemia/reperfusion [J]. *Pharmacology*, 2011, 8(8): 149-158.