

左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠海马血脑屏障紧密连接蛋白、IV型胶原蛋白和 α -平滑肌肌动蛋白表达的影响

杨 蕙², 杜 青¹, 赵洪庆¹, 谭小雯¹, 孟 盼¹, 王宇红^{1*}

1. 湖南省中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室培育基地, 湖南 长沙 410007

2. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007

摘要: **目的** 研究左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症(DD)大鼠海马血脑屏障紧密连接蛋白(ZO-1)、IV型胶原蛋白(CoIV)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)表达的影响。**方法** 采用ig高脂乳剂、尾iv链脲佐菌素(STZ, 38 mg/kg)、28 d慢性应激联合的方法建立DD大鼠模型并随机分为5组: 模型组, 阳性药(盐酸二甲双胍0.18 g/kg+百忧解1.8 mg/kg)组, 左归降糖解郁方高、中、低剂量(32.82、16.41、8.20 g/kg)组, 并以正常大鼠为对照组, 每组10只。给药4周后, 电镜下观察血脑屏障的形态变化, 免疫组化法检测海马血脑屏障CoIV、ZO-1、 α -SMA的表达情况。**结果** 与对照组比较, 模型组大鼠ZO-1、 α -SMA的表达下降, CoIV的表达升高, 差异显著($P < 0.05$); 与模型组比较, 阳性药组和左归降糖解郁方高剂量组大鼠ZO-1、 α -SMA的表达升高, CoIV的表达下降, 差异显著($P < 0.05$ 、 0.01)。**结论** 左归降糖解郁方可以保护DD大鼠血脑屏障的损伤, 其保护机制可能与升高血脑屏障ZO-1和 α -SMA的表达, 降低CoIV的表达有关。

关键词: 左归降糖解郁方; 糖尿病并发抑郁症; 紧密连接蛋白; IV型胶原蛋白; α -平滑肌肌动蛋白

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)21-3214-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.21.016

Effects of Zuogui Jiangtang Jieyu Formula on protein expression of CoIV, ZO-1, and α -SMA in hippocampal blood-brain barrier of diabetes mellitus rats with depression

YANG Hui², DU Qing¹, ZHAO Hong-qing¹, TAN Xiao-wen¹, MENG Pan¹, WANG Yu-hong¹

1. Training Bases, Hunan Key Laboratory of Chinese Materia Medica Powder and Innovative Drugs Established by Provincial and Ministry, Changsha 410007, China

2. First Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of Zuogui Jiangtang Jieyu Formula (ZJJF) on protein expression of CoIV, ZO-1, and α -SMA in hippocampal blood-brain barrier (BBB) in diabetes mellitus (DM) rats with depression. **Methods** DM rat model with depression was established by the combination of high-fat diet, injection of Streptozotocin (STZ, 38 mg/kg), and chronic stress. The model rats were randomly divided into five groups, DM with depression group, metformin (0.18 g/kg) + fluoxetine (1.8 mg/kg) group, high-, mid-, and low-dose (32.82, 16.41, and 8.20 g/kg) ZJJF groups ($n = 10$). After 4 weeks of administration, the morphological changes of BBB were observed under the electron microscope, the expression of CoIV, ZO-1, and α -SMA in rat hippocampal BBB was detected by immunocytochemistry. **Results** Compared with the control group, the expression of ZO-1 and α -SMA in the model group was decreased ($P < 0.05$), and the expression of CoIV was increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the expression of ZO-1 and α -SMA in metformin + fluoxetine group and high-dose ZJJF group was increased ($P < 0.05$, 0.01), and the expression of CoIV was decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** ZJJF could repair the damage of BBB in DM rats with depression, and the mechanism may be related to the expression regulation of CoIV, ZO-1, and α -SMA.

Key words: Zuogui Jiangtang Jieyu Formula; diabetes mellitus with depression; CoIV; ZO-1; α -SMA

糖尿病是由胰岛素分泌缺陷或抵抗引起机体特征; 社会压力的增大诱发糖尿病患者产生抑郁症、脂肪和蛋白质代谢异常, 以慢性高血糖为主要状, 并逐渐形成糖尿病并发抑郁症(diabetes mellitus)

收稿日期: 2015-02-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81373578, 81403379); 湖南省自然科学基金项目(13JJ5030); 湖南省科技厅科技计划项目(2012SK3141)

作者简介: 杨 蕙(1987—), 女, 研究实习员, 硕士, 研究方向为中药学。Tel: (0731)85369061 E-mail: 348541369@qq.com

*通信作者 王宇红, 博士生导师, 研究方向为药效组方筛选。Tel: (0731)85369061 E-mail: wyh107@126.com

with depression, DD)^[1]。目前,针对DD的机制研究多集中在下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴,对于血脑屏障损伤的分子机制研究甚少。Serlin等^[2]综述了血管病变、血脑屏障受损在2型糖尿病并发认知障碍中的作用,认为血脑屏障损伤是2型糖尿病并发抑郁症发生的重要因素。基底膜蛋白(CoIV)、紧密连接蛋白(ZO-1)、周细胞蛋白(α -SMA)分别是血脑屏障微血管基底膜、血管内皮、周细胞的标志蛋白,对维持血脑屏障结构功能完整性具有重要作用^[3-4]。DD的发生是否与血脑屏障CoIV、ZO-1、 α -SMA的表达异常有关,目前还未见报道。本课题组前期研究发现中药复方左归降糖解郁方对DD具有较好的治疗作用^[5],本实验采用左归降糖解郁方对DD大鼠进行干预,观察其对海马血脑屏障的作用及对CoIV、ZO-1、 α -SMA表达的影响,对深入探索DD血脑屏障的损伤及中药保护作用具有重要意义。

1 材料

1.1 药品与试剂

左归降糖解郁方(黄芪18g、贯叶连翘3g、姜黄9g、熟地黄15g、山茱萸12g、枸杞12g、菟丝子9g、杜仲9g、丹参12g、丹皮6g、牛膝9g)原药材均购自湖南中医药大学第一附属医院,并由该院制剂科按比例水煎浓缩后制成口服液100mL(相当于生药量1.14g/mL),一测多评法进行质量控制,其主要药效成分质量浓度分别为黄芪甲苷 ≥ 0.03 g/L、贯叶金丝桃素 ≥ 0.018 g/L、姜黄素 ≥ 0.4 g/L、丹酚酸B ≥ 1.2 g/L、丹皮酚 ≥ 0.2 g/L。链脲佐菌素(STZ),美国Sigma公司;兔抗大鼠CoIV、ZO-1、 α -SMA多克隆抗体,武汉博士德有限公司;高脂乳剂组成:10%胆固醇、0.2%丙硫氧嘧啶、20%猪油、2%胆酸钠、20%聚山梨酯、20%聚山梨酯-80、20%丙二醇,加蒸馏水至100mL;盐酸二甲双胍片(规格0.25g,批号1402115,湖南湘雅制药有限公司);百忧解(盐酸氟西汀胶囊,20mg,批号2087A,法国Patheon)。

1.2 实验动物

SPF级雄性SD大鼠60只,体质量180~220g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,许可证号SCXK(湘)2013-0004。

1.3 仪器

One Touch II血糖仪及血糖试纸(美国强生公司);动物行为学习记忆系统(法国Viewpoint公司);

Olympus生物显微镜(日本OLYMPUS公司);DVP-W7显微镜图像处理系统(南京长城信息系统公司);RM223切片机(德国莱卡公司);H600型透射电镜(日本日立公司)。

2 方法

2.1 DD大鼠模型的制备^[5]

SD大鼠以高脂乳剂10mL/kg连续ig14d,每天1次,末次ig后,大鼠禁食不禁水24h,1次性尾ivSTZ(溶于新鲜配制的0.1mol/L、pH值4.5枸橼酸缓冲液中,4℃保存)38mg/kg,对照组尾iv枸橼酸缓冲液,给药体积为2mL/kg。造模3d后,大鼠禁食不禁水6h,测定空腹血糖,空腹血糖 ≥ 16.00 mmol/L的大鼠为糖尿病模型成功大鼠。给予糖尿病模型大鼠慢性应激,具体包括4℃冰水浴5min、45℃热刺激5min、倾笼45°24h、噪音8h、昼夜颠倒24h、潮湿垫料(每笼200mL,24h)、夹尾1min,每天采用1种刺激,同种刺激不连续出现,共刺激28d。

2.2 动物分组与给药方法

50只DD模型大鼠随机分为5组:模型组,阳性药(盐酸二甲双胍0.18g/kg+百忧解1.8mg/kg)组,左归降糖解郁方高、中、低剂量(32.82、16.41、8.20g/kg)组,每组10只,各组大鼠应激造模的同时ig给药28d。另取10只SD大鼠作为对照组。对照组和模型组给予等体积的生理盐水。

2.3 血脑屏障电镜检测

取上述各组大鼠脑组织样本,用2.5%戊二醛浸泡固定后;再用1%锇酸(OsO_4)固定;丙酮逐级脱水;环氧树脂包埋;切超薄片,染色,透射电镜下观察,拍照。

2.4 免疫组化检测

大鼠用10%的水合氯醛麻醉后,快速开胸,心脏插管灌入生理盐水,待澄清液流出后,对其进行4%的多聚甲醛灌注,待大鼠四肢僵硬后,断头取全脑,保存在4%的多聚甲醛液中,石蜡包埋,制成5 μm 的石蜡切片。免疫组织化学进行染色:切片脱蜡至水,冲洗,加一抗4℃过夜,再加入二抗,脱水封片。在光学显微镜下观察每张玻片上3个不重复视野中CoIV、ZO-1、 α -SMA的阳性细胞数(阳性细胞为棕褐色),然后进行统计分析。

2.5 统计学处理

实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,运用SPSS 16.0统计软件进行统计分析,组间采用单因素方差分析

(One-way-ANOVA), t 检验, 双侧检验。

3 结果

3.1 血脑屏障电镜观察

与对照组比较, 模型组大鼠血脑屏障内皮细胞发生肿胀, 管腔狭窄, 星形胶质细胞水肿明显, 血脑屏障出现明显的损伤现象, 阳性药组与左归降糖解郁方高剂量组水肿明显减轻, 管腔狭窄得到缓解。中、低剂量组血脑屏障病理损伤改善不明显。结果见图 1。

3.2 各组大鼠海马血脑屏障 ZO-1、CoIV、 α -SMA 表达比较

与对照组比较, 模型组大鼠 ZO-1、 α -SMA 免

疫阳性细胞数减少, CoIV 阳性细胞数增多, 提示 ZO-1、 α -SMA 表达下降, CoIV 表达升高, 差异显著 ($P<0.05$)。与模型组比较, 阳性药组和左归降糖解郁方高剂量组 ZO-1、 α -SMA 免疫阳性细胞数增加, CoIV 阳性细胞数减少, 提示 ZO-1、 α -SMA 表达上升, CoIV 表达下降, 差异显著 ($P<0.05$ 、 0.01)。结果见表 1 和图 2。

4 讨论

我国约有 51% 的糖尿病患者存在不同程度的抑郁症, 其中轻度抑郁占 38%, 中度 8%, 重度 5%, 自杀的危险性高达 10%, 远高于普通人群的 0.01%~0.03%^[6], 其治疗成本高, 死亡率大。因此,

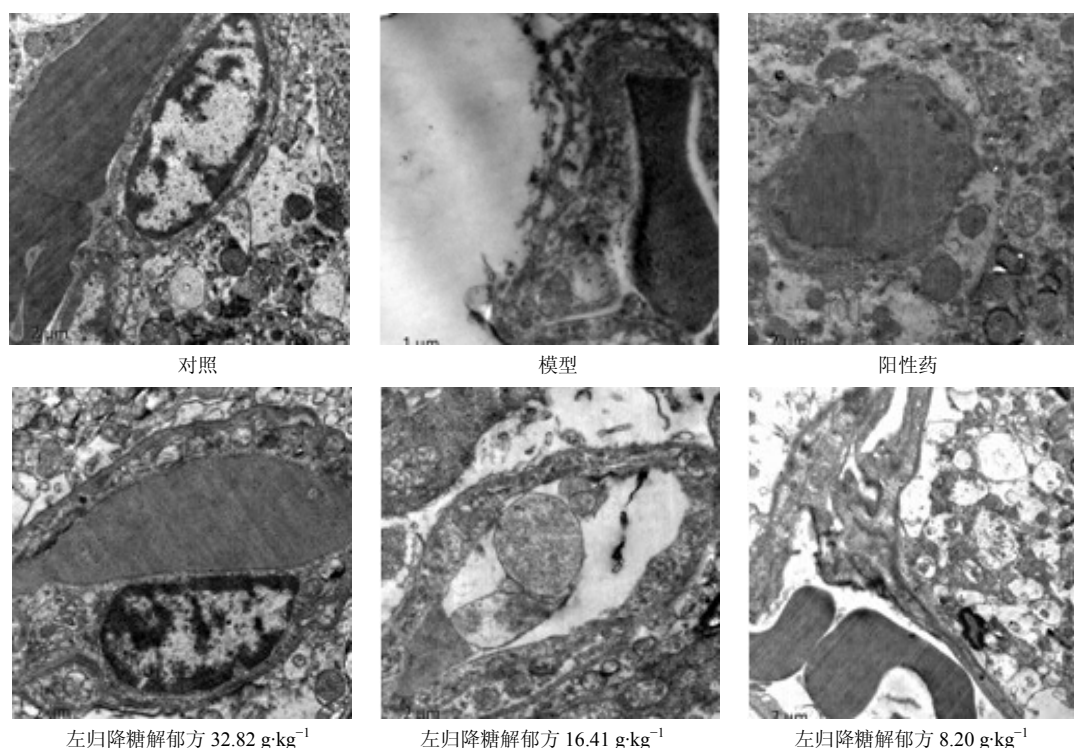


图 1 各组大鼠血脑屏障电镜观察结果

Fig. 1 Electron microscope results of BBB of rats in each group

表 1 各组大鼠海马 ZO-1、CoIV、 α -SMA 免疫阳性细胞数 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Numbers of ZO-1, CoIV, and α -SMA immunoreactive cells in hippocampus of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	ZO-1 阳性细胞数	CoIV 阳性细胞数	α -SMA 阳性细胞数
对照	—	18.50±0.77	44.50±0.71	28.05±0.94
模型	—	8.51±1.13*	71.00±1.31*	6.74±1.33*
阳性药	—	16.75±0.27 [#]	40.75±1.77 ^{##}	23.33±1.51 [#]
左归降糖解郁方	32.82	14.67±1.53 [#]	40.50±0.53 ^{##}	22.67±1.13 [#]
	16.41	12.49±0.71	54.47±0.23	12.63±0.63
	8.20	11.00±0.48	69.30±1.92	8.30±1.34

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

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

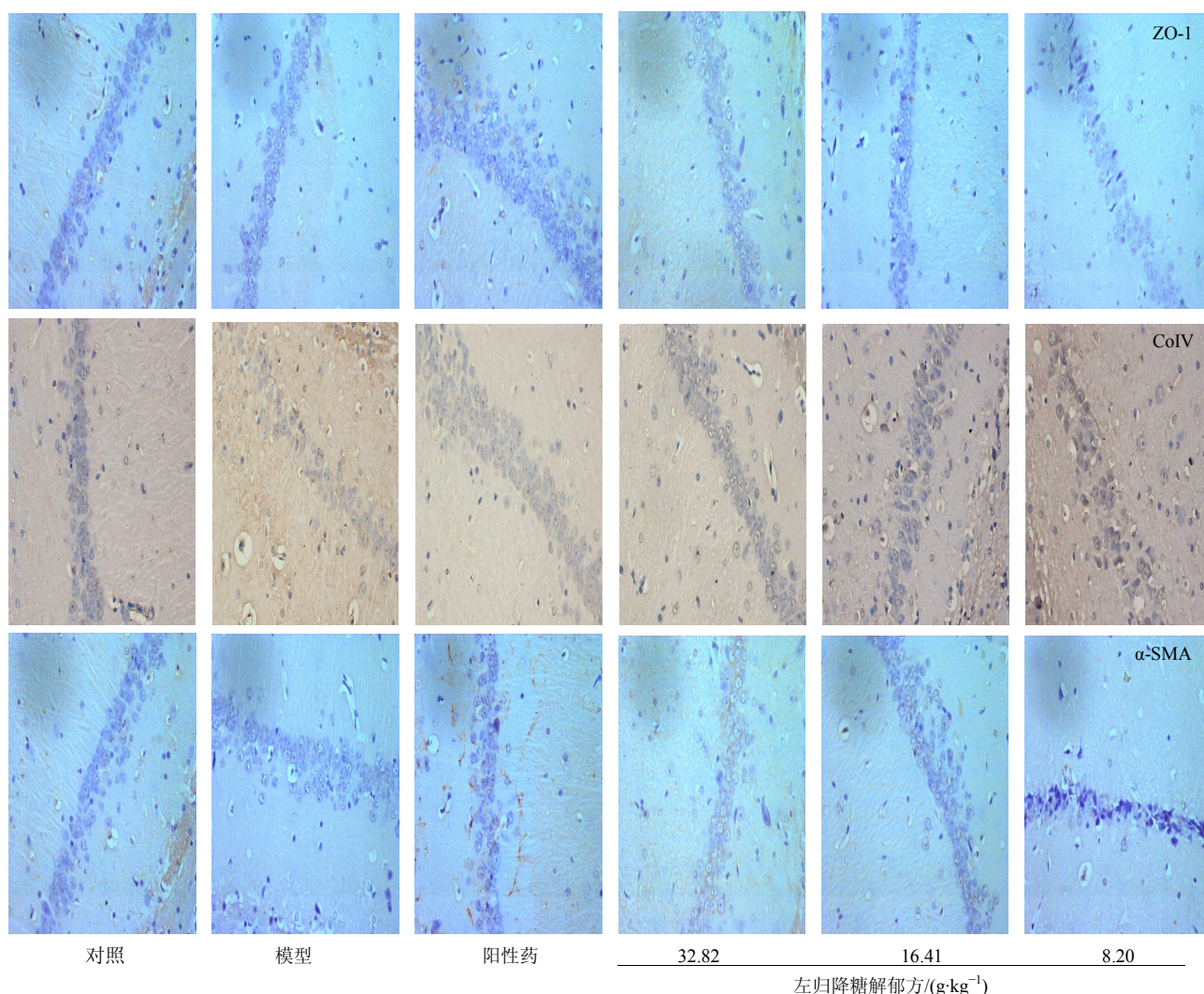


图 2 各组大鼠海马血脑屏障 ZO-1、CoIV、α-SMA 免疫组化结果

Fig. 2 Immunohistochemical results of ZO-1, α-SMA, and CoIV in hippocampal BBB of rats in each group

对 DD 的治疗已迫在眉睫。但是目前临床治疗多采用化学药，将糖尿病与抑郁症分开治疗，其作用单一，且副作用大。而传统中药可对 DD 进行多环节、多靶点调节且毒副作用小，疗效持久，应用前景广阔。本课题组前期研究发现中药复方左归降糖解郁方对 DD 具有较好的治疗作用，其机制与保护海马损伤有关^[7]。由于海马血脑屏障可依其屏障功能阻止血液中有有害物质进入脑内并损伤海马，所以海马的结构与功能正常与血脑屏障功能的完整性密切相关。因此，本实验继续以左归降糖解郁方为研究对象，观察其对血脑屏障的保护作用及对 CoIV、ZO-1、α-SMA 表达的影响。

血脑屏障是中枢神经系统特有的重要结构，由内到外有 4 层结构：脑毛细血管内皮细胞之间紧密连接、毛细血管基膜、星形胶质细胞终足和周细胞^[8]。

在电镜下观察到模型组大鼠血脑屏障内皮细胞发生肿胀，星形胶质细胞水肿。给予左归降糖解郁方干预后，模型大鼠海马血脑屏障的损伤得到明显改善。

ZO-1 是一类在上皮和血管内皮细胞紧密连接胞质表面的高分子量磷蛋白^[9]，其中一个功能是组织紧密连接的组件，并将组件连接到皮层肌动蛋白细胞的骨架中去^[10]，其表达与血脑屏障的通透性有着紧密联系。本研究发现，与对照组比较，DD 大鼠 ZO-1 表达减少，结果推测 ZO-1 的减少使微血管紧密连接不能连接到皮层肌动蛋白细胞的骨架中去，从而使血脑屏障紧密连接开放，导致血脑屏障发生损伤。与模型组大鼠相比，左归降糖解郁方高剂量组大鼠 ZO-1 表达增加。

基底膜是血脑屏障的重要组成部分，对血脑屏障的屏障作用维持起着重要作用^[11]。CoIV 是血脑

屏障基底膜的核心胶原成分,与层粘连蛋白有很高的亲和力,广泛分布于基底膜的透明层,二者结合形成基底膜的骨架,是基底膜主要的组成蛋白^[12]。有研究表明,糖尿病时由于血糖增高刺激 IV 型胶原蛋白及层粘连蛋白合成,并使转录这些分子的 mRNA 水平升高,促使毛细血管基底膜增厚^[13],因而测定 IV 型胶原水平可以反映基底膜的代谢情况。本研究发现,与对照组比较 DD 大鼠 CoIV 表达增多。推测在 DD 病理条件下,CoIV 表达增多,使基底膜骨架发生变化,进而导致基底膜增厚,血脑屏障结构功能发生改变。而与模型组大鼠相比,左归降糖解郁方高剂量组大鼠 CoIV 表达减少。

α -SMA 是周细胞表型转化的标志^[14]。周细胞表型转化是指周细胞经过各种有害机制作用受到损伤时,细胞形态、结构发生改变,在糖尿病病理条件下,氧化应激使线粒体发生损伤,致使血脑屏障周细胞损伤^[15]。本研究发现,与对照组大鼠相比,DD 大鼠 α -SMA 表达减少,推测 α -SMA 表达的减少致使周细胞从正常的收缩型向合成型转化,导致周细胞丢失。与模型组大鼠相比,左归降糖解郁方高剂量组大鼠 α -SMA 表达增加。

左归降糖解郁方是以张景岳左归饮、左归丸为基础方化裁而得,由熟地黄、枸杞、山茱萸、牛膝、菟丝子、杜仲、黄芪、姜黄、贯叶连翘组成,整方共奏滋阴益气、化瘀解郁的功效。本实验研究发现,其能明显改善 DD 大鼠血脑屏障病理损伤,推测其可能是通过调控海马血脑屏障 ZO-1、CoIV、 α -SMA 的表达,分别改善内皮细胞、基底膜细胞、周细胞的形态结构功能,进行协同保护血脑屏障结构稳定。

参考文献

- [1] Egede L E, Ellis C. Diabetes and depression: Global perspectives [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2010, 87(3): 302-312.
- [2] Serlin Y, Levy J, Shalev H. Vascular pathology and blood-brain barrier disruption in cognitive and psychiatric complications of type 2 diabetes mellitus [J]. *Cardiovasc Psychiatry Neurol*, 2011. doi: org/10.1155/2011/609202.
- [3] Hawkins B T, Lundeen T F, Norwood K M. Increased blood-brain barrier permeability and altered tight junctions in experimental diabetes in the rat: Contribution of hyperglycaemia and matrix metalloproteinases [J]. *Diabetologia*, 2007, 50(1): 202-211.
- [4] Huber J D. Diabetes, cognitive function, and the blood-brain barrier [J]. *Curr Pharm Des*, 2008, 14(16): 1594-1600.
- [5] 王宇红, 杨 蕙, 尹玲桃, 等. 左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠血糖血脂的影响 [J]. *中草药*, 2014, 45(11): 1602-1606.
- [6] 张 娟, 毕 艳, 沈山梅, 等. 2 型糖尿病患者抑郁的患病率及相关危险因素分析 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2011, 2(10): 796-799.
- [7] Wang Y H, Yin L T, Yang H, *et al*. Hypoglycemic and anti-depressant effects of Zuogui Jiangtang Jieyu formulation in a model of unpredictable chronic mild stress in rats with diabetes mellitus [J]. *Exp Ther Med*, 2014, 18(1): 281-285.
- [8] 余爱勇. 糖尿病对血脑屏障影响的研究进展 [J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2008, 38(2): 150-153.
- [9] Howarth A G, Hughes M R, Stevenson B R. Detection of the tight junction-associated protein ZO-1 in astrocytes and other nonepithelial cell types [J]. *Am J Physiol*. 1992, 262(2 Pt1): 461-469.
- [10] Fanning A S, Jameson B J, Jesaitis L A, *et al*. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occluding and the actin cytoskeleton [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(45): 29745-29753.
- [11] 董小平, 喻 斌, 金 路, 等. 血脑屏障的细胞组成研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(8): 281-284.
- [12] Hayashi Y, Makino H, Ota Z. Serum and urinary concentrations of type IV collagen and laminin as a marker of microangiopathy in diabetes [J]. *Diabetes Med*, 1992, 9(4): 366-370.
- [13] Nishikawa T, Giardino I, Edelstein D, *et al*. Changes in diabetic retinal matrix protein mRNA levels in common transgenic mouse strain [J]. *Curr Eye Res*, 2000, 21(1): 581-587.
- [14] Margarti A, Zeng L, Xu Q. Stem cells, Vascular smooth muscle cells and atherosclerosis [J]. *Histol Histopathol*, 2006, 21(9): 979-985.
- [15] 许庆梅. 糖尿病大鼠侧脑室脉络丛及脑小血管基底膜的观察和脑小血管 α -SMA 及 CD31 表达的研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2011.