

左归降糖解郁方对自噬介导的糖尿病并发抑郁症大鼠海马神经血管单元中神经元损伤的保护作用及其机制

刘 检^{1,4}, 刘 林¹, 唐 林¹, 韩远山¹, 杨 蕙¹, 凌 佳², 龙红萍¹, 蔺晓源¹, 王宇红^{2,3,4*}

1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007

2. 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 410208

3. 湖南中医药大学 科技创新中心, 湖南 长沙 410208

4. 湖南中医药大学 中医学国内一流建设学科, 湖南 长沙 410208

摘 要: **目的** 探讨左归降糖解郁方(ZGF)对自噬介导的糖尿病并发抑郁症(diabetes mellitus with depression, DD)大鼠海马神经血管单元(neurovascular unit, NVU)中神经元的保护作用及其机制。**方法** 原代分离、纯化和培养SD大鼠海马神经元、星形胶质细胞及脑微血管内皮细胞,构建海马NVU体外共培养体系,并进行免疫细胞化学染色鉴定。采用高糖(150 mmol/L)联合皮质酮(200 μ mol/L)干预制备海马NVU细胞模型,实验设对照组、模型组、空白血清对照组和ZGF含药血清组。采用Furo-3/AM染色法检测海马NVU神经元细胞内钙水平,高内涵细胞成像分析技术(high content analysis, HCA)检测海马NVU神经元细胞内自噬标志物自噬相关蛋白1(Beclin-1)、人微管相关蛋白轻链3II(LC3-II)及谷氨酸受体2(GluR2)/Ca²⁺/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路关键蛋白的表达,TUNEL染色法观察各组海马神经元细胞凋亡。**结果** 与对照组比较,模型组及空白血清对照组海马NVU神经元细胞内钙水平显著升高,自噬标志物Beclin-1、LC3-II蛋白表达水平显著升高,GluR2、mTOR蛋白表达水平显著降低,AMP依赖的蛋白激酶(AMPK)蛋白表达水平显著升高,且细胞凋亡明显增多;与模型组比较,ZGF含药血清组海马NVU神经元细胞内钙水平明显降低,自噬标志物Beclin-1、LC3-II蛋白表达水平降低,GluR2/Ca²⁺/mTOR信号通路中GluR2、mTOR蛋白表达水平升高,AMPK蛋白表达水平降低,同时细胞凋亡显著减少。**结论** ZGF对自噬介导的DD大鼠海马NVU神经元细胞损伤具有明显的保护作用,其作用机制与调控GluR2/Ca²⁺/mTOR信号通路及细胞凋亡有关。

关键词: 左归降糖解郁方;糖尿病并发抑郁症;神经血管单元;海马神经元;自噬;凋亡;GluR2/Ca²⁺/mTOR信号通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)10-2420-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.10.024

Protective effects and mechanism of Zuogui Jiangtang Jieyu Formulation on hippocampal neuron of NVU induced by autophagy in diabetes mellitus with depression

LIU Jian^{1,4}, LIU Lin¹, TANG Lin¹, HAN Yuan-shan¹, YANG Hui¹, LING Jia², LONG Hong-ping¹, LIN Xiao-yuan¹, WANG Yu-hong^{2,3,4}

1. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China

2. Hunan Key Laboratory of Chinese Materia Medica Power and Innovative Drugs Co-founded by Province and Ministry, Changsha 410208, China

3. Institute of Innovation and Applied Research, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

4. The Domestic First Class Construction Discipline of Chinese Medicine in Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: Objective To investigate the protective effects and mechanism of Zuogui Jiangtang Jieyu Formulation (ZGF) on hippocampal neuron of neurovascular unit (NVU) induced by autophagy in diabetes mellitus with depression (DD). **Methods** Hippocampal neurons,

收稿日期: 2019-01-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81573965);国家自然科学基金资助项目(81703694);湖南省自然科学基金项目(2017JJ3241);湖南省教育厅科学研究项目(17C1229);湖南中医药大学中医学一流学科开放基金(2018ZYX47)

作者简介: 刘 检(1986—),男,硕士,主要从事中药精神与神经药理学研究。E-mail: 474299877@qq.com

***通信作者** 王宇红,女,博士,教授,博士生导师。E-mail: wyh107@126.com

astrocytes and brain microvascular endothelial cells from SD rats were primitively isolated, purified and cultured, and then immunocytochemistry staining was employed to identify primitive cells. The DD model of NVU was established by applying intervention of high glucose (150 mmol/L) and cortisone (200 μ mol/L) after co-culture system was built *in vitro*. The cultured cells were randomly divided into normal group, blank serum group, model group, and medicated serum of ZGF group. Intracellular calcium levels (Ca^{2+}) on hippocampal neuron of NVU was detected by Furo-3/AM staining. The expression of autophagy marker Beclin-1, LC3-II, and GluR2/ Ca^{2+} /mTOR signaling pathway key proteins was detected by high content analysis. The apoptosis of hippocampal neurons was observed by TUNEL staining. **Results** Compared with the normal group, Ca^{2+} levels was remarkably increased, expression of autophagy marker Beclin-1 and LC3-II was dramatically up-regulated, proteins expression of GluR2 and mTOR was obviously down-regulated while AMPK up-regulated, and the apoptosis in hippocampal neuron of NVU was significantly increased in model and blank serum group. Compared with the model group, intracellular calcium levels was obviously decreased, expression of autophagy marker Beclin-1 and LC3-II was down-regulated, GluR2/ Ca^{2+} /mTOR signaling pathway proteins expression of GluR2, mTOR was up-regulated while AMPK down-regulated, furthermore the apoptosis of hippocampal neurons was significantly decreased in ZGF group. **Conclusion** ZGF has significant protective effects on hippocampal neuron of NVU induced by autophagy in DD, and its mechanism is related to the GluR2/ Ca^{2+} /mTOR signaling pathway and apoptosis.

Key words: Zuogui Jiangtang Jieyu Formulation; diabetes mellitus with depression; neurovascular unit; hippocampal neuron; autophagy; apoptosis; GluR2/ Ca^{2+} /mTOR signaling pathway

糖尿病是一种最常见的慢性代谢性疾病,据世界卫生组织统计,2017年糖尿病患者为4.25亿人,而预计到2045年将高达6.29亿,该病并发症多,其中患抑郁症(DD)的几率为15.3%~36%,远高于非糖尿病患者^[1-2]。目前DD发病机制尚未阐明,课题组前期研究发现大鼠海马组织损伤的病理进程中,谷氨酸失衡激活自噬介导的神经元凋亡可能是诱发DD的关键环节^[3]。谷氨酸受体2(GluR2)作为谷氨酸 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异噁唑丙酸(AMPA)受体的关键亚基^[4],糖尿病状态下海马神经血管单元(NVU)微血管通透性增加,血浆中高浓度皮质酮(CORT)进入星形胶质细胞(AS),与糖皮质激素受体(GR)结合,造成谷氨酸转运体表达紊乱,谷氨酸含量增加进入神经元后造成AMPA受体过度激活,引发其亚基重组,GluR2亚单位表达下调,介导 Ca^{2+} 快速内流,激活自噬造成海马神经元凋亡,最终诱发DD。因此,调控自噬进而抗海马神经元凋亡可能是治疗DD的重要靶点。

左归降糖解郁方(ZGF)是由熟地黄、山茱萸、杜仲、丹参、姜黄等10余种中药组成的复方,方中熟地补益肾阴为君;山茱萸、枸杞为臣,辅君滋补肾阴;佐以牛膝、杜仲补肝肾,黄芪补气健脾,丹参、丹皮活血祛瘀,姜黄化瘀行气,贯叶连翘疏肝解郁,全方共奏滋阴益气、化瘀解郁的作用。前期研究表明,ZGF能显著抑制DD大鼠海马神经元凋亡^[5-6],但其机制有待阐明。本实验制备DD海马NVU损伤模型,从体外细胞分子水平探讨ZGF对自噬介导的DD大鼠海马NVU神经元细胞凋亡的

保护作用及其机制。

1 材料

1.1 动物

SD大鼠,雌性,受孕15~17 d;SD乳鼠,雌雄兼用,3日龄及10日龄;SD大鼠8只,雌雄各半,体质量180~220 g,均由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,许可证号SCXK(湘)2016-0002。

1.2 药物与试剂

ZGF由熟地黄15 g、丹参12 g、丹皮6 g、山茱萸12 g、枸杞12 g、菟丝子9 g、贯叶连翘3 g、姜黄9 g、牛膝9 g、杜仲9 g与黄芪18 g组成,均由湖南中医药大学第一附属医院提供(批号180927);兔抗大鼠神经元特异性烯醇化酶(NSE)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、血小板-内皮细胞黏附分子(CD31)抗体(武汉博士德生物工程有限公司);兔抗大鼠谷氨酸受体2(GluR2)、自噬相关蛋白1(Beclin-1)、人微管相关蛋白轻链3-II(LC3-II)、AMP依赖的蛋白激酶(AMPK)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)抗体及FITC标记羊抗兔IgG、R-PE标记羊抗小鼠IgG(美国Proteintech公司);小鼠抗大鼠 β -tubulin(美国Abcam公司);Furo-3/AM(美国Molecular Probes公司);*In Situ* Cell Death Detection凋亡试剂盒(Roche公司)。

1.3 仪器

TDZ5-WS型低速多管架自动平衡离心机(湖南湘仪实验仪器开发有限公司);S8PAO型解剖显微镜(Leica公司);IX71型倒置荧光显微镜(Olympus公司);OPERETTA型高内涵细胞成像分

析系统 (HCA, PerkinElmer 公司)。

2 方法

2.1 大鼠海马 NVU 体外培养体系的建立

2.1.1 海马神经元的分离及培养 取孕 16~18 d 的 SD 大鼠, 水合氯醛麻醉后迅速取全脑置于解剖显微镜下, 参照文献方法^[7]分离原代海马神经元, 调整细胞密度为 3.0×10^5 个/mL, 接种至左旋多聚赖氨酸包被的细胞培养板中, 4 h 后全量换成无血清培养液 (96% Neurobasal、2% B27、1% Glutamax 和 1% 双抗), 每隔 3 d 半量换液。

2.1.2 AS 的分离及培养 取 3 d 的新生 SD 大鼠, 参照文献方法^[8]分离原代 AS, 调整细胞密度为 3.0×10^6 个/L, 接种至左旋多聚赖氨酸包被的细胞培养瓶中, 差速黏附处理 1 h, 轻轻翻转培养瓶, 吸出细胞悬液接种至另一细胞培养瓶中, 置于细胞培养箱中, 每隔 3 d 半量换液, 待细胞长满便可传代, 同时采用差速贴壁和震荡相结合的方法进行细胞纯化。

2.1.3 脑微血管内皮细胞 (BM) 的分离及培养 取 10 d 的新生 SD 大鼠, 消毒后迅速取出大脑至预冷 D-Hank's 液的培养皿中, 体视显微镜下去除大脑白质、残余大血管和软脑膜, 将大脑皮质剪碎后用 D-Hank's 液洗涤, 1 200 r/min 离心 3 min, 弃上清, 1:1 加入 25% 牛血清白蛋白后反复吹悬, 2 500 r/min 离心 8 min, 重复 2 次, 将离心后的血管沉淀按 1:2 加 0.1% 的 II 型胶原酶, 37 °C 消化 40 min, 1 200 r/min 离心 5 min, 重悬、计数, 并按每毫升 1×10^4 个血管段接种于预先用 1% 明胶包被的细胞培养瓶中; 置于细胞培养箱中培养, 24 h 后半量换液。以后每 2~3 天换液, 待细胞长满时即可进行消化传代。

2.1.4 海马 NVU 体外培养体系的建立及细胞鉴定 如图 1 所示, 先将神经元细胞接种至 24 孔细胞培养板中, 培养 5~7 d, 备用。参照文献方法^[3]将 AS 消化后, 调整细胞密度为 2.5×10^5 /mL, 接种至 24 孔 Transwell 小室外侧, 依靠张力作用静止培养 40~50 min, 然后将小室翻正, PBS 洗涤未贴壁的细胞, 将小室放入预先已接种上述海马神经元的 24 孔细胞培养板内, 并在小室外侧加入 1 mL AS 培养液, 待神经元细胞和 AS 共培养 2 d 后, 取消化后的 BM, 调整细胞密度为 1.5×10^5 /mL, 接种至 Transwell 小池内侧, 并在其内补入 1 mL BM 培养液, 继续于培养箱中共培养 3 d, 即可成功构建海马 NVU 共培养体系。弃掉细胞培养孔内液体, 冷 0.01 mol/L PBS 润洗 3 次, 然后分别经 4% 多聚甲醛固定 30 min、

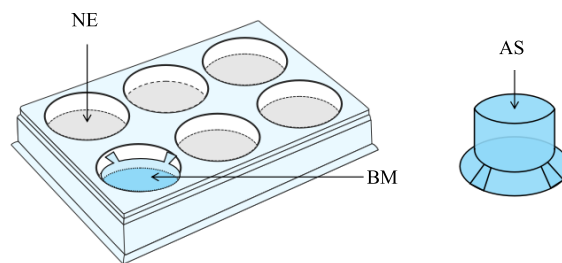


图 1 海马 NVU 体外培养体系的构建

Fig. 1 Diagram of *in vitro* cultivation system of hippocampal NVU

0.25% Triton-100 作用 15 min 及 5% BSA 封闭 30 min 后, 加入兔抗大鼠 NSE 和小鼠抗大鼠 β -tubulin 一抗 (1:100) 稀释液, 4 °C 湿盒避光孵育过夜。次日弃液, 冷 0.01 mol/L PBS 润洗 5 次, 加入 FITC 标记的山羊抗兔和 RP-E 标记的山羊抗小鼠二抗 (1:200) 稀释液, 37 °C 避光孵育 30 min, 弃液, 冷 0.01 mol/L PBS 润洗 5 次, 加入 DAPI 稀释液, 室温避光孵育 20 min, 弃液, 最后每孔加入 50 μ L PBS, 于 HCA 上对神经元细胞观察并拍照。同上操作, 加入相应兔抗大鼠一抗稀释液 GFAP 或 PECAM-1/CD31 (1:100) 和 FITC 标记的山羊抗兔二抗 (1:200) 稀释液, 分别于 HCA 和倒置荧光显微镜上对 AS 和 BM 进行免疫细胞化学染色鉴定。

2.2 ZGF 含药血清的制备

取 SD 大鼠 8 只, 雌雄各半, 按体质量及性别随机分为 2 组: 受试药含药血清组和空白血清对照组, 分别 ig 给予临床等效剂量 3 倍的左归降糖解郁方 (32.82 g/kg) 和等量蒸馏水, 每日 2 次, 连续 5 d, 末次给药 2 h 后, 腹主动脉取血, 4 500 r/min 离心 15 min, 收集血清, 56 °C 水浴灭活 30 min, 0.22 μ m 微孔滤膜滤过后, 分装至 -80 °C 冰箱, 备用。

2.3 DD 大鼠海马 NVU 体外损伤模型的制备及给药

大鼠海马 NVU 共培养体系构建成功后, 参照文献方法^[3,7]加入高糖 (150 mmol/L) 和皮质酮 (200 μ mol/L) 至 Transwell 小池内侧, 干预作用 18 h, 建立模拟 DD 损伤环境的海马 NVU 体外模型。并将其随机分为 4 组: 对照组、模型组、空白血清对照组和 ZGF 含药血清组, 对照组与模型组给予等量培养液, 其余各组在造模同时分别加入 10% 的含药血清及空白血清。

2.4 DD 大鼠海马 NVU 神经元细胞内钙水平测定

各组经造模干预及药物处理 18 h 后, 移除 Transwell 小池, 采用无钙 D-Hank's 液轻轻润洗海

马神经元2次,加入终浓度5 $\mu\text{mol/L}$ 的Furo-3/AM工作液,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育45 min,于HCA上进行荧光检测并拍照,并以单个细胞的平均荧光强度值反映海马NVU神经元细胞 Ca^{2+} 水平的变化。

2.5 DD大鼠海马NVU神经元细胞内自噬标志物Beclin-1、LC3-II蛋白水平测定

各组细胞经造模干预及药物处理18 h后,弃掉孔内液体,冷0.01 mol/L PBS润洗2次,分别经4%多聚甲醛固定30 min、0.25% Triton-100作用15 min及5% BSA封闭30 min后,加入兔抗大鼠Beclin-1或LC3-II一抗(1:200)稀释液,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育过夜,弃液,冷0.01 mol/L PBS润洗3次,加入FITC标记的山羊抗兔二抗(1:400)稀释液,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30 min,弃液,冷0.01 mol/L PBS润洗3次,加入DAPI稀释液,室温避光孵育20 min,弃液,最后每孔加入50 μL PBS,于HCA上进行荧光检测并拍照,并以单个细胞的平均荧光强度值反映各蛋白相对表达水平。

2.6 DD大鼠海马NVU神经元细胞内GluR2、AMPK、mTOR蛋白水平的测定

各组细胞经造模干预及药物处理18 h后,除加入的一抗为兔抗大鼠GluR2、AMPK或mTOR一抗稀释液(1:200)外,其余操作同“2.5”项,最后于HCA上进行荧光检测并拍照,并以单个细胞的平均荧光强度值反映各蛋白相对表达水平。

2.7 TUNEL染色法检测DD大鼠海马NVU神经元细胞凋亡

造模干预18 h后,移除Transwell小池,弃掉孔内培养液,冷0.01 mol/L PBS润洗2次,分别经4%多聚甲醛固定25 min、0.2% Triton-100处理5 min及3% H_2O_2 作用2 min后,加入50 μL 预先配制的TUNEL反应混合液(50 μL TdT+450 μL 荧光素标记的dUTP),37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒,避光,孵育1 h,弃液,冷0.01 mol/L PBS润洗3次,最后于荧光显微镜下观察细胞凋亡情况。

2.8 统计学处理

采用SPSS 16.0统计软件进行处理,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。先对数据进行方差齐性检验,不同组间比较采用One-Way ANOVA分析,其中方差齐性采用LSD检验,方差非齐性采用Dunnett's T3检验。

3 结果

3.1 DD大鼠海马NVU各细胞形态及免疫荧光鉴定

将DD大鼠海马NVU共培养体系中的海马神

经元细胞、AS和BM置于光学显微镜下观察,可见神经元细胞胞体明显、突起纵横交错,并相互交织成丰富神经网络。AS胞体折光性较低,突足多且细长;BM则呈现典型的铺路石样结构特点。经免疫细胞化学染色,HCA或荧光显微镜拍照后,绿色荧光显示为阳性表达,其中神经元细胞阳性表达NSE,AS阳性表达GFAP,BM阳性表达CD31,这提示所得细胞均为目标细胞。结果见图2。

3.2 ZGF对DD大鼠海马NVU神经元细胞钙水平的影响

与对照组比较,空白血清对照组及模型组海马NVU神经元细胞内Furo-3/AM平均荧光强度值显著升高($P < 0.01$),表明细胞内钙水平显著增加。与模型组比较,ZGF含药血清组海马NVU神经元细胞内Furo-3/AM平均荧光强度值显著降低($P < 0.01$),提示ZGF能显著调控模拟DD环境下的细胞内钙超载。结果见图3。

3.3 ZGF对DD大鼠海马NVU神经元内自噬标志物Beclin-1、LC3-II蛋白表达的影响

与对照组比较,空白血清对照组及模型组海马NVU神经元细胞内Beclin-1、LC3-II蛋白表达水平显著增加($P < 0.05$ 、 0.01),表明自噬标志物相关蛋白表达水平显著上调,自噬被激活。与模型组比较,ZGF含药血清组海马NVU神经元细胞内Beclin-1、LC3-II蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$ 、 0.01),提示ZGF对DD大鼠海马NVU神经元细胞内Beclin-1、LC3-II蛋白具有明显的调控作用,并能显著抑制自噬过度激活。结果见图4。

3.4 ZGF对DD大鼠海马NVU神经元内GluR2、AMPK、mTOR蛋白表达的影响

与对照组比较,空白血清对照组及模型组海马NVU神经元细胞内GluR2、mTOR蛋白表达水平显著降低,AMPK蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$ 、 0.01)。与模型组比较,ZGF含药血清组海马NVU神经元细胞内GluR2、mTOR蛋白表达水平升高,而AMPK蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$ 、 0.01),提示ZGF对DD大鼠海马NVU神经元细胞内GluR2/ Ca^{2+} /mTOR信号通路相关蛋白具有明显的调控作用。结果见图5。

3.5 ZGF对DD大鼠海马NVU神经元细胞凋亡的影响

倒置荧光显微镜下观察各组细胞,TUNEL染色结果显示,与对照组比较,空白血清对照组及模

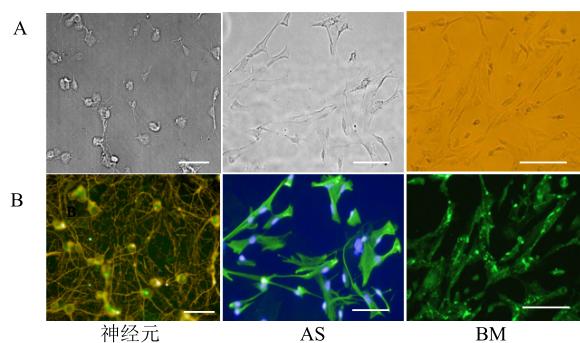
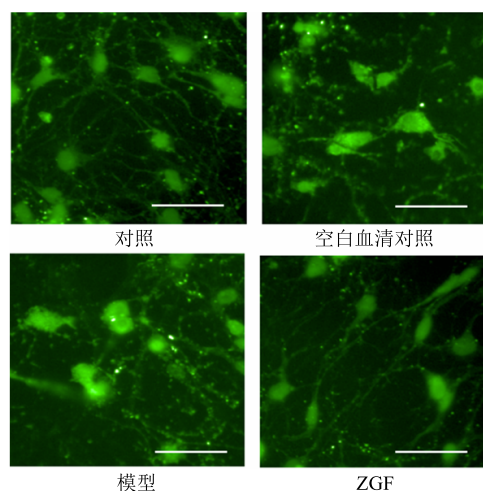


图 2 海马 NVU 各细胞形态学 (A) 及免疫细胞化学 (B) 鉴定 (bar = 100 μ m)

Fig. 2 Morphology (A) and immunocytochemical (B) identification of hippocampal NVU (bar = 100 μ m)

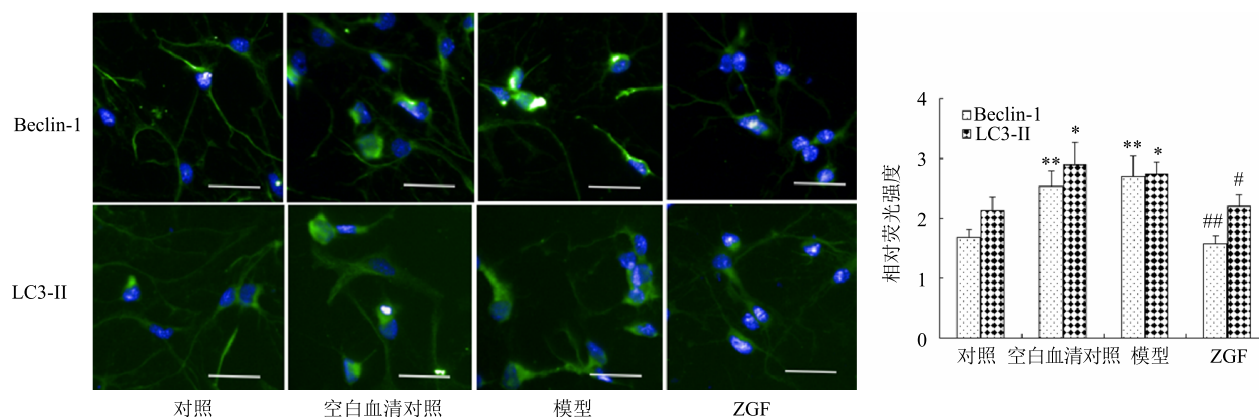


与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group

图 3 ZGF 对 DD 大鼠海马 NVU 神经元细胞钙水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$, bar = 100 μ m)

Fig. 3 Effects of ZGF on calcium levels in hippocampal neurons of NVU in rat with DD ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$, bar = 100 μ m)



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

图 4 ZGF 对 DD 大鼠海马 NVU 神经元内自噬标志物 Beclin-1、LC3-II 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$, Bar = 100 μ m)

Fig. 4 Effects of ZGF on protein expression of Beclin-1 and LC3-II in hippocampal neurons of NVU in rats with DD ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$, Bar = 100 μ m)

型组海马 NVU 神经元凋亡细胞数量较多, 且呈现典型凋亡特征, 核固缩、染色质浓染, 核偏于一侧, 呈马蹄形或新月形, 阳性凋亡细胞呈绿色着染。与模型组比较, ZGF 含药血清组海马 NVU 神经元细胞凋亡数量显著降低, 核固缩、染色质浓染减轻, 提示 ZGF 能明显抑制模拟 DD 环境下海马 NVU 神经元细胞凋亡。结果见图 6。

4 讨论

NVU 是一种由海马神经元、血脑屏障微血管 (VE) 和 AS 等组成的功能结构单元, 共同维持海马内环境稳态和神经递质动态平衡^[9]。现阶段有关 DD 的研究主要以神经元为单一靶标, 而在海马

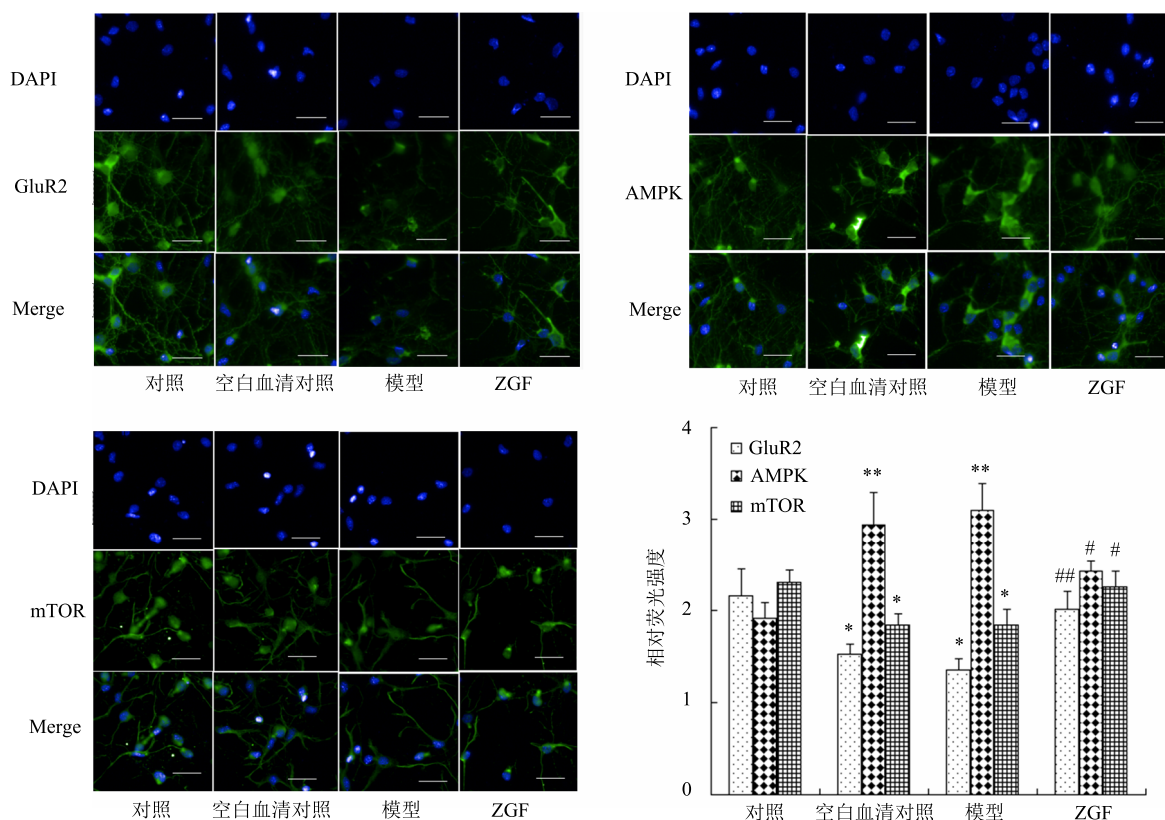


图 5 ZGF 对 DD 大鼠海马 NVU 神经元内 GluR2、AMPK、mTOR 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3, \text{Bar} = 100 \mu\text{m}$)

Fig. 5 Effects of ZGF on protein expression of GluR2, AMPK, and mTOR in hippocampal neurons of NVU in rats with DD ($\bar{x} \pm s, n = 3, \text{Bar} = 100 \mu\text{m}$)

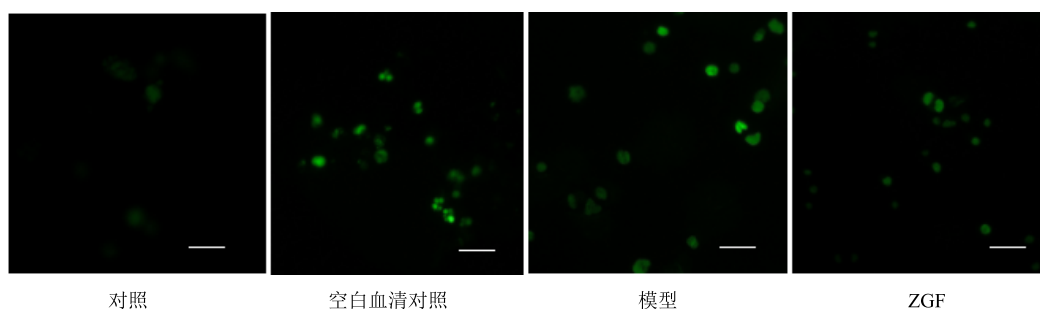


图 6 ZGF 对 DD 大鼠海马 NVU 神经元细胞凋亡的影响 (Bar = 100 μm)

Fig. 6 Effects of ZGF on hippocampal neurons apoptosis of NVU in rats with DD (Bar = 100 μm)

NVU 整体环境下研究神经元较少, NVU 概念的提出, 革新了人们对大脑中枢神经系统病理生理学基础的认识, 同时也契合中医整体辨证论治观念, 这为整体视角研究 DD 发病机制提供了新方向。

DD 继发于糖尿病, 海马又是其病程中的关键靶点, 通过介导海马损伤进而诱发 DD, 而细胞凋亡又在海马损伤中起着关键性作用, 本课题组前期研究发现^[10], 在糖尿病状态下, 大鼠海马 NVU 血脑屏障结构受损, 微血管通透性增加, 促使高浓度

皮质酮进入 AS, 造成其谷氨酸转运体-1 (EAAT-1) 与囊泡谷氨酸转运体 (VGluT) 平衡打破^[11], 细胞间隙中谷氨酸含量异常升高, 进入神经元后通过神经兴奋性毒性最终导致海马神经元凋亡。另有研究表明, 细胞凋亡与细胞自噬密切相关, 当自噬被激活后, 海马神经元细胞凋亡促进蛋白 Bax、Caspase-8 表达增加, 凋亡抑制蛋白 Bcl-2 显著下调, Bcl-2/Bax 平衡被打破, 导致线粒体外膜通透性改变, 磷酸化 JNK Thr183 和 Tyr185 位点, JNK 被活化后可直接

转录 Caspase-8, 并激活凋亡相关转录激活因子 Elk-1 与 c-fos, 通过 JNK/Elk-1/c-fos 通路以内源性途径启动 C-Jun 介导的细胞凋亡程序^[12-13]。因此, 推测自噬介导的细胞凋亡在 DD 疾病进程中起着关键作用。

AMPK/mTOR 是一条与细胞自噬密切相关的信号通路, 现已明确其下游激酶可调控 Bax、Bcl-2 等凋亡基因及蛋白的表达, 进而调节细胞的凋亡过程^[14-15]。然而在 DD 状态下, 谷氨酸异常增高激活自噬介导的海马 NVU 神经元凋亡是如何发生的, 其机制尚未完全阐明。已知谷氨酸 AMPA 受体是一类由 GluR1~R4 4 个亚单位组成的离子型谷氨酸受体, 其主要分布于海马锥体 CA1 区, GluR2 是其关键亚基, GluR2 缺乏的受体, 对 Ca^{2+} 有高度的通透性, 在多种神经性损伤疾病中, GluR2 表达下调, 细胞内钙水平显著增加^[4]。当细胞间隙中 Glu 含量升高, 促使海马 NVU 神经元内 AMPA 受体异常活化及亚基重组, GluR2 表达下调, 并引发 Ca^{2+} 可以毫无阻碍地通过 AMPA 受体, 造成 Ca^{2+} 快速内流, 细胞内钙超载, 激活钙/钙调蛋白激酶依赖性激酶- β (CaMKK- β) 后增加 AMPK 活性^[16-17], 然后磷酸化结节蛋白复合物 2 (TSC2) 进而抑制 mTOR 的激活因子小 G 蛋白 (RHE), 通过负反馈调控 mTOR 活性, 并磷酸化其下游效应分子 S6K 激酶, 启动相关基因转录与蛋白翻译, 最终激活细胞自噬^[18-19]。

本课题组长期从事 DD 的中医病机研究, 通过多年临床探索与实践, 认为 DD 属中医“消渴”合并“郁病”的范畴。消渴发病与肾脏密切相关, 消渴可致郁病的发生。若肾阴精不足, 则髓海空虚, 气虚无以行血则血停为瘀, 阴虚而虚火上熬则瘀阻脑络, 终致清窍失养、神明不用、情志异常, 发为郁病。郁病又可加重消渴的进程。若情志不畅、肝失疏泄、气郁化火, 则伤津耗液、耗气伤阴, 可致中气不足、血脉瘀滞。肝火犯肺, 则多饮; 肝火灼脾, 则多食; 肝火损肾, 则多尿。因此, 消渴与郁病互为因果, 相兼为病。故 DD 的基本病机可用“虚、瘀、郁”来概括, 治宜滋阴益气、化瘀解郁。ZGF^[20]中熟地补益肾阴为君; 山茱萸、枸杞、菟丝子为臣, 辅君滋补肾阴; 佐以牛膝、杜仲补肝肾, 黄芪补气健脾, 丹参、丹皮活血祛瘀, 姜黄化瘀行气, 贯叶连翘疏肝解郁, 全方共奏滋阴益气、化瘀解郁的作用。

本研究结果显示, 与对照组比较, 模型组海马 NVU 神经元细胞内钙水平显著增加, 谷氨酸 AMPK

受体亚基 GluR2 表达下调, AMPK/mTOR 信号通路中 AMPK 表达增加而 mTOR 表达降低, 且自噬标志物 Beclin-1、LC3-II 蛋白表达明显上调, 细胞凋亡明显增多。当给予 ZGF 干预后, DD 海马 NVU 神经元细胞内钙水平显著降低, GluR2 表达上调, AMPK/mTOR 信号通路关键蛋白表达异常被明显逆转, 自噬标志物 Beclin-1、LC3-II 水平降低, 同时细胞凋亡显著减少。因此推测, ZGF 对自噬介导的糖尿病并发抑郁症海马 NVU 神经元细胞具有明显损伤的保护作用可能是通过调控 GluR2/ Ca^{2+} /mTOR 信号通路而实现的。

综上所述, ZGF 可有效调控海马 NVU 神经元自噬, 抑制其凋亡, 并对自噬介导的糖尿病并发抑郁症海马 NVU 神经元细胞损伤具有明显的保护作用, 其作用机制与调控 GluR2/ Ca^{2+} /mTOR 信号通路有关。

参考文献

- [1] Ziegler R, Neu A. Diabetes in childhood and adolescence [J]. *Dtsch Arztebl Int*, 2018, 115(9): 146-156.
- [2] Islam S M, Ferrari U, Seissler J, *et al*. Association between depression and diabetes amongst adults in Bangladesh: A hospital based case-control study [J]. *J Glob Health*, 2015, doi: 10.7189/jogh.05.020.
- [3] 刘 检, 王宇红, 凌 佳, 等. 左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症海马 NVU 神经元的调控作用及其机制 [J]. 北京中医药大学学报, 2018, 41(9): 752-758.
- [4] Man H Y. GluR2-lacking, calcium-permeable AMPA receptors-inducers of plasticity? [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2011, 21(2): 291-298.
- [5] 凌 佳, 杨 琴, 刘 检, 等. 左归降糖解郁方对模拟糖尿病并发抑郁症环境下模型大鼠海马神经元凋亡相关蛋白的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2017, 24(10): 35-39.
- [6] 赵洪庆, 杜 青, 凌 佳, 等. 左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠海马神经元 JNK/Elk-1/c-fos 通路的调控作用 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2016, 21(6): 625-629.
- [7] 刘 检, 王宇红, 徐雅岚, 等. 改良的胎鼠海马神经元原代培养及模拟糖尿病并发抑郁环境对其的损伤作用 [J]. 神经解剖学杂志, 2016, 32(4): 459-465.
- [8] 刘 检, 王宇红, 徐雅岚, 等. 大鼠脑皮质星形胶质细胞的原代培养、纯化及采用 HCA 技术进行 GFAP 鉴定 [J]. 沈阳药科大学学报, 2016, 33(7): 581-587.
- [9] Han H S, Suk K. The function and integrity of the neurovascular unit rests upon the integration of the

- vascular and inflammatory cell systems [J]. *Curr Neurovasc Res*, 2005, 2(5): 409-423.
- [10] 王宇红, 谭小雯, 柴 上, 等. 左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠海马谷氨酸及 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸受体 2A、2B 的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2015, 22(10): 70-73.
- [11] 徐雅岚, 赵洪庆, 杜 青, 等. 左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠海马区星形胶质细胞谷氨酸转运体的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2016, 39(6): 470-475.
- [12] Guma M, Firestein G S. c-Jun *N*-terminal kinase in inflammation and rheumatic diseases [J]. *Open Rheumatol J*, 2012, doi: 10.2174/1874312901206010220.
- [13] Su S H, Wu Y F, Lin Q, *et al*. Cannabinoid receptor agonist WIN55, 212-2 and fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 suppress chronic cerebral hypoperfusion-induced neuronal apoptosis by inhibiting c-Jun *N*-terminal kinase signaling [J]. *Neuroscience*, 2015, doi: 10.1007/s00210-017-1417-9.
- [14] Zhu J, Chen Y, Ji Y, *et al*. Gemcitabine induces apoptosis and autophagy via the AMPK/mTOR signaling pathway in pancreatic cancer cells [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2018, 65(5): 665-671.
- [15] 佳娜提·达吾列提, 姜 楠, 寇俊萍, 等. 调节细胞自噬的中药有效成分研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(16): 2283-2292.
- [16] Maria H H, Marja J. AMP-activated protein kinase: A universal regulator of autophagy? [J]. *Autophagy*, 2007, 3(4): 381-383.
- [17] Meng X F, Yu J T, Song J H, *et al*. Role of the mTOR signaling pathway in epilepsy [J]. *J Neurol Sci*, 2013, doi: 10.1016/j.jns.2013.05.029.
- [18] 唐晓娟. Ca-A/K 通道在缺氧缺血性脑损伤新生大鼠海马神经元自噬发生中的作用 [D]. 苏州: 苏州大学, 2014.
- [19] Bootman M D, Chehab T, Bultynck G, *et al*. The regulation of autophagy by calcium signals: Do we have a consensus? [J]. *Cell Calcium*, 2017, doi: 10.1016/j.ceca.2017.08.005.
- [20] 藺晓源, 韩远山, 孟 盼, 等. 糖尿病并发抑郁症“虚、瘀、郁”的中医病机探讨 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(8): 1942-1943.