

左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠海马胰岛素抵抗的影响

杨 蕙¹, 刘 检¹, 唐 林¹, 简晓源¹, 罗薇絮², 韩远山¹, 刘 林¹, 孟 盼², 王宇红^{2*}

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, 湖南中医药大学, 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大鼠海马胰岛素抵抗的调节作用。**方法** 建立糖尿病并发抑郁症大鼠模型, 并随机分为4组, 模型组, 阳性药组(二甲双胍 0.18 g/kg+氟西汀 1.8 mg/kg), 左归降糖解郁方高、低剂量组(20.52、10.26 g/kg), 另设健康大鼠为对照组。各组大鼠 ig 给药 28 d 后, 采用血糖仪及 ELISA 法检测空腹血糖及外周胰岛素抵抗程度。采用旷野实验和强迫游泳实验检测大鼠抑郁样行为。采用免疫荧光法和 Western blotting 法检测大鼠海马胰岛素受体磷酸化蛋白(p-IR)、磷酸化的胰岛素受体底物-1(p-IRS-1)的表达, 采用 Western blotting 法检测海马磷酸化的磷脂酰肌醇 3-激酶(p-PI3K)、磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt)蛋白的表达。**结果** 与对照组比较, 模型组大鼠血糖显著升高并伴随明显的外周胰岛素抵抗, 其在旷野实验中的活动次数显著降低、在强迫游泳实验中的不动时间显著延长; 蛋白检测结果表明大鼠脑内 p-IR、p-IRS-1、p-PI3K、p-Akt 表达水平均显著降低。与模型组比较, 左归降糖解郁方高剂量组大鼠血糖水平显著降低, 外周胰岛素抵抗水平减轻, 其在旷野实验中的活动次数显著增加、在强迫游泳实验中的不动时间显著缩短, 而海马内 p-IR、p-IRS-1、p-PI3K、p-Akt 表达显著升高。**结论** 左归降糖解郁方可有效调节糖尿病并发抑郁症大鼠海马胰岛素信号通路, 从而改善动物脑内的胰岛素抵抗状态。

关键词: 左归降糖解郁方; 糖尿病并发抑郁症; 海马; 胰岛素抵抗; 胰岛素受体(IR); 胰岛素受体底物-1(IRS-1); 磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K); 蛋白激酶 B(Akt)

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2020)11-3013-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.11.020

Effects of Zuogui Jiangtang Jieyu Formulation on insulin resistance in hippocampus of rats with diabetes-related depression

YANG Hui¹, LIU Jian¹, TANG Lin¹, LIN Xiao-yuan¹, LUO Wei-xu², HAN Yuan-shan¹, LIU Lin¹, MENG Pan², WANG Yu-hong²

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

2. Key Laboratory of Chinese Materia Medica Power and Innovation Drugs Established by Provincial and Ministry, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China

Abstract: Objective To investigate the function of Zuogui Jiangtang Jieyu Formulation on hippocampal insulin resistance in rats with diabetes-related depression. **Methods** The rat model of diabetes-related depression was established and randomly divided into four groups, including model group, positive drug group (metformin 0.18 g/kg + fluoxetine 1.8 mg/kg), high (20.53 g/kg) and low (10.26 g/kg) doses of Zuogui Jiangtang Jieyu Formulation groups. After 28 d of gavage, fasting blood glucose and peripheral insulin resistance were measured by blood glucose meter and ELISA. The depression-like behaviors of rats were tested by open field experiment and forced swimming test. The expression of p-IR and p-IRS-1 in hippocampus of rats were detected by immunofluorescence and Western blotting, while the levels of p-PI3K and p-Akt were detected by Western blotting. **Results** Compared with the normal group, the blood glucose of rats in model group were significantly increased, which accompanied by obvious peripheral insulin resistance. The number of activities in open field experiment was significantly reduced in model group, and the immobility time in forced swimming experiment was significantly prolonged. In addition, it was showed that the levels of p-IR, p-IRS-1, p-PI3K and p-Akt in the brain of model rats were all significantly decreased. Compared with the model group, the blood glucose and insulin levels were significantly decreased in high-dose of

收稿日期: 2019-09-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81603604); 湖南省自然科学基金项目(2019JJ50464); 湖南中医药大学中医学国内一流建设学科开放基金(2018ZYX46); 湖南中医药大学中医学国内一流建设学科项目(2018)

作者简介: 杨 蕙, 女, 助理研究员, 博士研究生, 从事中药学研究。Tel: 15675185123 E-mail: philomena_yh@sina.com

*通信作者 王宇红, 女, 教授, 从事中药新药研究。E-mail: wyh_107@163.com

Zuogui Jiangtang Jieyu Formulation group. Furthermore, the depression-like behaviors manifested in open field experiment and forced swimming experiment were improved by high dose of Zuogui Jiangtang Jieyu Formulation. More importantly, the expression of p-IR, p-IRS-1, p-PI3K and p-Akt in hippocampus was significantly increased in high dose of Zuogui Jiangtang Jieyu Formulation group compared with model group. **Conclusion** Zuogui Jiangtang Jieyu Formulation can effectively regulate the insulin signaling pathway in hippocampus of rats with diabetes-related depression, and then improve the insulin resistance in the brain of model rats.

Key words: Zuogui Jiangtang Jieyu Formulation; diabetes-related depression; hippocampus; insulin resistance; InsR; IRS-1; PI3K; Akt

糖尿病患者并发抑郁症的比例大约是正常人的 2 倍^[1]。依据第五版《精神障碍诊断和统计手册》显示,重度抑郁症的主要症状是情绪低落,并伴有能量消耗下降、思维改变、食欲减退、睡眠紊乱或自杀^[2]。而上述症状也被发现单独或多个同时存在于糖尿病患者中,此外,抑郁症状被认为与糖尿病的诸多不良临床特点,如血糖控制差、饮食习惯不规律和运动依从性差等紧密相关^[3]。外周胰岛素抵抗是糖尿病的典型病理特征,当胰岛素通过血脑屏障进入大脑后,通过作用于胰岛素受体丰富的大脑局部,如海马等,则可参与抑郁症的发生。在中枢神经系统中,胰岛素抵抗的主要表现形式为胰岛素信号异常,其核心起因是胰岛素受体(IR)与其底物胰岛素受体底物-1(IRS-1)结合障碍,随后可影响下游信号磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)和蛋白激酶 B(Akt)的活化^[4]。上述异常胰岛素信号可进一步通过损伤神经细胞能量代谢功能、介导神经再生障碍、降低突触可塑性、影响奖赏系统(reward system)和下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA 轴)反应性等过程参与抑郁症的发生^[5]。本课题组前期研究发现,糖尿病并发抑郁症大鼠海马中存在胰岛素信号异常^[6],而左归降糖解郁方对于外周胰岛素抵抗有较好的调节作用^[7],但其对中枢胰岛素抵抗的作用尚不明确。故本实验拟进一步研究左归降糖解郁方对中枢胰岛素信号的调控作用,为其临床应用提供参考。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 40 只,体质量 180~220 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号 SCXK(湘)2016-0002。实验前适应性饲养于 SPF 动物房中,保持温度 20~24 °C,湿度为 40%~60%,共饲养 7 d,动物自由摄食与饮水。

1.2 药物与试剂

左归降糖解郁方的组成药物为黄芪 18 g、贯叶连翘 3 g、姜黄 9 g、熟地黄 15 g、山茱萸 12 g、枸杞 12 g、菟丝子 9 g、杜仲 9 g、丹参 12 g、丹皮 6 g、牛膝 9 g,原药材均购自湖南中医药大学第一附属医

院,经湖南中医药大学第一附属医院药剂科主管药师唐林鉴定,所有药味质量均符合《中国药典》2015 年版规定;盐酸二甲双胍片(规格 0.25 g,批号 20180342),湖南湘雅制药有限公司生产;百忧解(盐酸氟西汀胶囊,规格 20 mg,批号 7723A),法国 Patheon 公司生产;链脲佐菌素(STZ,规格 100 mg,批号 1012C031),购自 Solarbio 公司;免疫荧光染色试剂盒购自武汉博士德有限公司;增强型 BCA 蛋白定量试剂盒购自 Absin 公司;超敏 ECL 化学发光试剂盒购自新赛美生物科技有限公司;胰岛素受体磷酸化蛋白(p-IR)兔抗大鼠多克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司;IR、IRS-1 及其磷酸化蛋白(p-IRS-1)、磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)及其磷酸化蛋白(p-PI3K)、Akt 及其磷酸化蛋白(p-Akt)兔抗大鼠多克隆抗体购自 Affinity Biosciences 公司。

1.3 仪器

Open-field 敞箱和强迫游泳杯均购自美国东乐自然基因生命科学公司;MK3 型酶标仪购自美国 Thermo 公司;蛋白印迹系统购自美国 Bio-Rad 公司;Nikon Eclipse C1 正置荧光显微镜购自日本 Nikon 公司。

2 方法

2.1 左归降糖解郁方水煎液的制备

按照左归降糖解郁方组方药材配比称取各药材,进行水煎浓缩,第 1 次按照生药总量的 10 倍量加水煎煮 1.5 h,第 2 次按照 8 倍量加水煎煮 1 h,合并 2 次煎液并浓缩,制备成生药质量浓度为 1.14 g/mL 的中药提取液(含黄芪甲苷 3.08 mg/mL、贯叶金丝桃素 2.35 mg/mL、姜黄素 2.58 mg/mL、丹酚酸 B 1.08 mg/mL、丹皮酚 1.95 mg/mL)。该处方的临床日用量为 1 个处方量,即 114 g/kg,按照体表面积等剂量换算,大鼠每日的复方用量即为 10.26 mg/kg,实验设定左归降糖解郁方低剂量为复方等倍量(10.26 mg/kg),高剂量为复方 2 倍量(20.52 mg/kg)。

2.2 分组与给药

依次给予大鼠高脂乳剂 ig 14 d、小剂量 STZ 尾 iv (38 mg/kg)、慢性温和不可预知应激 28 d 刺激,制备糖尿病并发抑郁症大鼠模型^[8],并随机分为 4

组: 模型组, 阳性药组 (二甲双胍 0.18 g/kg+氟西汀 1.8 mg/kg), 左归降糖解郁方高、低剂量组 (20.52、10.26 g/kg), 每组 8 只。另取 8 只正常 SD 大鼠作为对照组。各组大鼠按照给药体积 10 mL/kg, ig 给予相应药物, 对照组和模型组 ig 给予等体积蒸馏水。各组连续给药 28 d (给药与慢性应激同时进行)。

2.3 样本采集与处理

给药 28 d 后, 对各组大鼠进行行为学检测。随后, 各组大鼠尾尖采血检测血糖, 腹主动脉取血检测胰岛素含量, 并取出全脑一分为二。左侧大脑浸泡于 4% 多聚甲醛中, 常温避光保存, 用于免疫荧光检测。右侧大脑剥离海马, 置于液氮中速冻, 并于实验结束后, 转移至 -80 °C 冰箱, 用于 Western blotting 检测。

2.4 指标检测

2.4.1 血糖、胰岛素检测及外周胰岛素抵抗指数计算 大鼠禁食 6 h 后, 剪尾尖取血, 并采用血糖仪检测大鼠空腹血糖 (FPG)。腹主动脉取血后采用 ELISA 试剂盒检测血清胰岛素 (FINS) 水平。计算外周胰岛素抵抗指数 (胰岛素抵抗指数 = FPG × FINS/22.5) [7]。

2.4.2 旷场实验 所用敞箱长 100 cm、宽 100 cm, 底部划分为 25 个面积相等的方格。实验时, 每只大鼠共进行 4.5 min, 其中前 1.5 min 为适应时间, 后 3 min 为实验时间。实验采用计数方式统计大鼠的活动次数, 动物前行 1 格 (四爪全部爬过 1 个方格) 或四处张望 1 次 (前爪腾空或攀附在箱壁上) 均计为活动 1 次。实验结束后, 以大鼠活动的总次数进行统计分析。实验过程中, 房间保持安静及光线昏暗。且应注意每只大鼠结束实验后, 及时清理敞箱内的动物排泄物, 以免对后面的动物造成气味干扰。

2.4.3 强迫游泳实验 本实验共计 4 min, 其中前 1 min 为适应时间, 后 3 min 为实验时间。实验时以大鼠漂浮在水面, 四肢均不动为不动状态, 并计时。实验结束后, 以大鼠的不动时间进行统计分析。实验时应注意大鼠入水后, 其后肢或尾巴不能碰到杯底。每隔 3 只动物, 换 1 次水, 每次水位保持一致。

2.4.4 免疫荧光检测 大鼠全脑在多聚甲醛中固定 2 d 后取出, 石蜡包埋并切片。将切片脱蜡至水后进行抗原修复。随后将切片样本画圈并进行自发荧光淬灭, 在圈内滴加 BSA 孵育 30 min 进行血清封闭。封闭后, 轻甩封闭液, 在切片上分别滴加 p-IR 和 p-IRS-1, 并于湿盒内 4 °C 孵育过夜。次日将玻片置于 PBS (pH 7.4) 中脱色洗涤 3 次, 每次 5 min。稍甩

干后在圈内滴加相应二抗覆盖组织, 避光室温孵育 50 min。随后, DAPI 复染细胞核, 继而封片, 并于荧光显微镜下观察和采集图像, 分析海马中 p-IR 和 p-IRS-1 表达的荧光度值。在本实验中, DAPI 紫外激发波长 330~380 nm, 发射波长 420 nm, 发蓝光; FITC 激发波长 465~495 nm, 发射波长 515~555 nm, 发绿光。

2.4.5 Western blotting 检测 将待测样本置于裂解液中, 并加入磷酸化酶抑制剂和蛋白酶抑制剂。冰上充分研磨样本后静置 2 h。随后采用 BCA 蛋白浓度试剂盒测定样本蛋白质量浓度, 以保证每个蛋白样品的上样量一致。实验前, 在蛋白样本中加入适量蛋白上样缓冲液, 并于 100 °C 水浴锅中变性 10 min。随后, 于 SDS-PAGE 凝胶加样孔内加入等量变性蛋白样本, 进行蛋白电泳。电泳结束后, 在 Bio-Rad 湿式转膜装置中进行转膜。转膜结束后, 封闭 2 h, 并分别加入 p-IR、p-IRS-1、p-PI3K、p-Akt、IR、IRS-1、PI3K、Akt, 4 °C 孵育过夜。一抗稀释度均为 1:1 000。次日, 取出膜并恢复至室温。采用 TBST 洗 3 次, 每次 10 min。随后加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:4 000), 室温孵育 1 h。最后, 采用 TBST 洗 3 次, 每次 10 min, 并用 ECL 进行显色。所得蛋白条带的图像分析采用 Image J 软件。

2.5 统计学分析

采用统计软件 SPSS 16.0 进行数据分析, 所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各指标采用单因素方差分析 (ANOVA) 进行统计。

3 结果

3.1 左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠血糖的改善作用

与对照组比较, 模型组大鼠 FPG 和 FINS 水平均显著升高, 外周胰岛素抵抗明显 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 阳性药组和左归降糖解郁方高剂量组大鼠 FPG、FINS 和胰岛素抵抗指数均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01); 而左归降糖解郁方低剂量组大鼠仅胰岛素抵抗指数有显著性改善 ($P < 0.05$)。结果见表 1。

3.2 左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠抑郁样行为的改善作用

与对照组比较, 模型组大鼠在旷场实验中的活动次数显著减少, 在强迫游泳实验中的不动时间则显著延长 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 阳性药组和左归降糖解郁方高剂量组大鼠的活动次数显著增加而游泳不动时间则显著缩短 ($P < 0.05$ 、 0.01), 即抑郁样程度减轻。结果见表 2。

表 1 各组大鼠 FPG、INS 及 IR 结果 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)Table 1 Results of FPG, INS, and IR of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	FPG/(mmol·L ⁻¹)	FINS/(mmol·L ⁻¹)	胰岛素抵抗指数
对照	—	5.43 ± 0.74	45.25 ± 8.91	10.95 ± 2.84
模型	—	23.98 ± 4.09**	96.58 ± 16.30**	103.56 ± 28.74**
阳性药 (二甲双胍 + 氟西汀)	0.18 + 0.001 8	14.59 ± 5.37##	75.98 ± 16.56#	49.15 ± 18.41##
左归降糖解郁方	10.26	19.68 ± 4.03	85.12 ± 11.70	73.16 ± 11.99#
	20.52	15.60 ± 4.05##	79.44 ± 14.72#	55.59 ± 20.11##

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$, 下表同

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group, same as below tables

表 2 各组大鼠抑郁样行为检测结果 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)Table 2 Results of depression-like behaviors of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	活动次数	不动时间/s
对照	—	46.75 ± 8.48	60.63 ± 22.93
模型	—	5.00 ± 3.21**	138.00 ± 18.06**
阳性药 (二甲双胍 + 氟西汀)	0.18 + 0.001 8	29.88 ± 7.00##	101.13 ± 26.24##
左归降糖解郁方	10.26	10.75 ± 7.15	124.38 ± 20.96
	20.52	18.88 ± 8.69##	110.13 ± 21.79#

3.3 左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠海马 p-IR、p-IRS-1 表达的影响

本实验采用免疫荧光及 Western blotting 法对各组大鼠海马 p-IR、p-IRS-1 的表达进行了分析。免疫荧光结果发现, p-IR 在海马神经元的细胞质和细胞核中均有表达, 而 p-IRS-1 则主要表达于细胞核中, 结果见图 1 和图 2。进一步定量分析可知, 与对照组比较, 模型组大鼠海马 p-IR、p-IRS-1 荧光强度均显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 阳性药组和左归降糖解郁方高剂量组可有效提高 p-IR、p-IRS-1 的荧光强度 ($P < 0.01$), 而左归降糖解郁方低剂量仅可显著增加 p-IRS-1 的表达水平 ($P < 0.05$), 结果见表 3。同时, 采用 Western blotting 进行定量分析发现, 与对照组比较, 模型组大鼠海马 p-IR/IR 表达水平和 p-IRS-1/IRS-1 值显著降低 ($P < 0.01$); 而与模型组比较, 阳性药和左归降糖解郁方高剂量可有效升高 p-IR/IR 表达水平和 p-IRS-1/IRS-1 的值 ($P < 0.05, 0.01$), 结果见表 4 和图 3。

3.4 左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠海马 p-PI3K 和 p-Akt 表达的影响

采用 Western blotting 方法对胰岛素的经典下游信号通路 PI3K/Akt 进行检测。结果发现, 与对照组比较, 模型组大鼠海马 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 值显著降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较,

阳性药组和左归降糖解郁方高剂量组大鼠海马 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 值升高 ($P < 0.05$), 结果见表 4 和图 4。

4 讨论

左归降糖解郁方是由黄芪、贯叶连翘、姜黄、熟地黄、山茱萸、枸杞、菟丝子、杜仲、丹参、丹皮、牛膝组成, 方中熟地为君, 滋养肾阴, 山茱萸、枸杞为臣, 合君药以加强滋补肾阴作用, 佐以菟丝子、牛膝、杜仲补肝肾, 黄芪健脾益气, 丹参、丹皮活血散瘀, 姜黄、贯叶连翘化痰行气、疏肝解郁。全方主要针对糖尿病并发抑郁症的“虚、淤、郁”中医病机, 通过疏肝解郁、活血化痰治法发挥治疗作用^[9]。前期通过体外细胞实验发现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细胞损伤具有明显的保护作用, 其作用机制与调控谷氨酸受体 2 亚基 (GluR2) /Ca²⁺/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号通路及细胞凋亡有关^[10]。本实验研究发现, 给予糖尿病并发抑郁症模型大鼠左归降糖解郁方干预后, 模型大鼠的血糖显著降低, 外周胰岛素抵抗程度减轻; 而从旷野实验和强迫游泳实验可见, 模型大鼠的抑郁不动时间明显缩短, 即抑郁样情绪有所改善。

最新研究认为, 脑胰岛素抵抗是糖尿病和抑郁症的共享发病机制^[5]。海马中存在 IR 和 IRS-1 的共

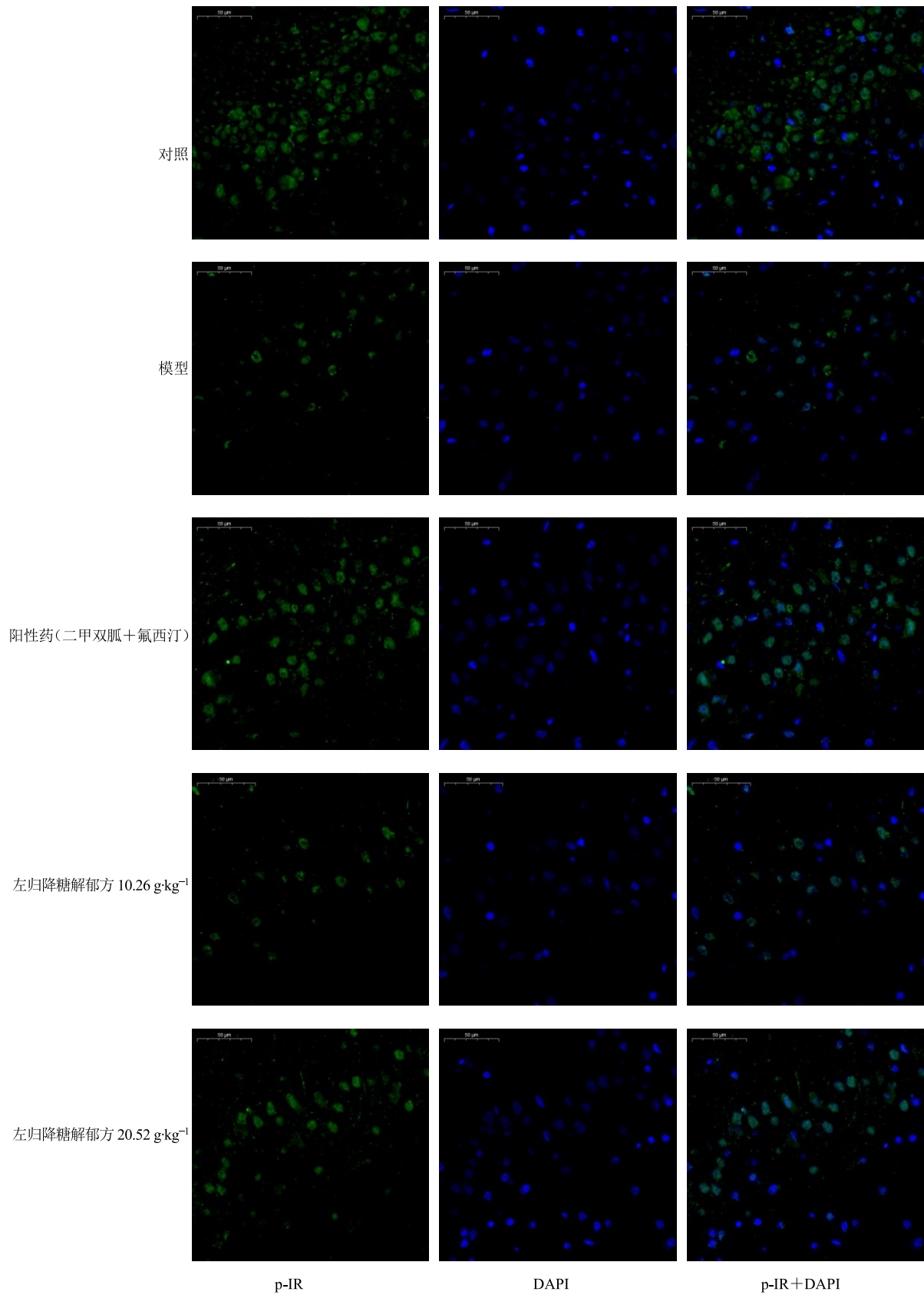


图1 各组大鼠海马 p-IR 的免疫荧光染色 (×400)

Fig. 1 Immunofluorescence results of p-IR in hippocampus of rats in each group (×400)

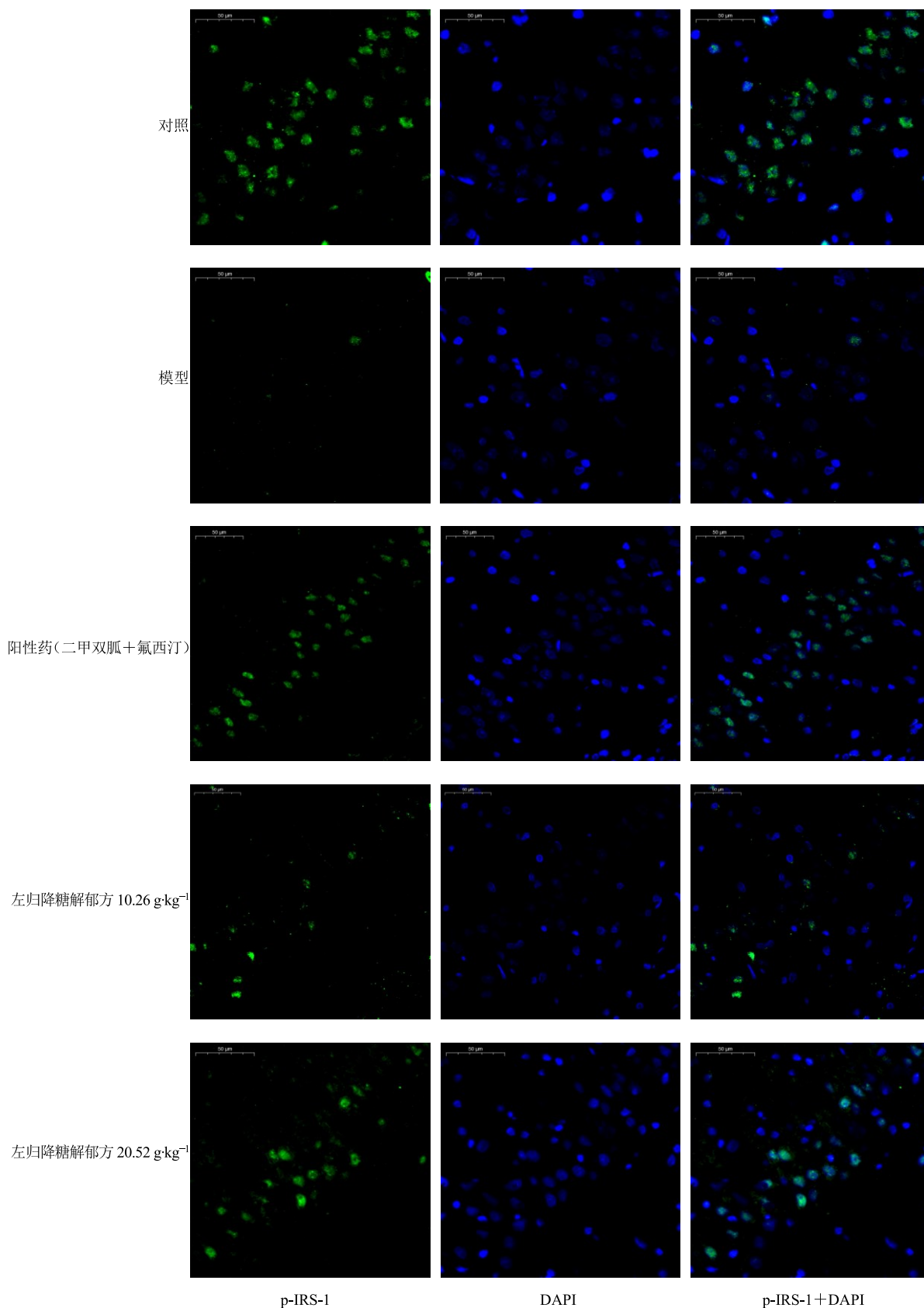


图2 各组大鼠海马 p-IRS-1 的免疫荧光染色 (×400)

Fig. 2 Immunofluorescence results of p-IRS-1 in hippocampus of rats in each group (×400)

表 3 各组大鼠海马 p-IR、p-IRS-1 的荧光度值 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Fluorescence density of p-IR and p-IRS-1 in hippocampus of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	p-IR	p-IRS-1
对照	—	9.232 ± 0.565	5.474 ± 0.400
模型	—	1.135 ± 0.260**	0.464 ± 0.133**
阳性药 (二甲双胍 + 氟西汀)	0.18 + 0.001 8	5.298 ± 0.324 [#]	3.354 ± 0.247 [#]
左归降糖解郁方	10.26	1.475 ± 0.283	0.866 ± 0.253 [#]
	20.52	4.376 ± 0.394 [#]	2.499 ± 0.404 [#]

表 4 各组大鼠海马 p-IR/IR、p-IRS-1/IRS-1、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 值 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Value of p-IR/IR, p-IRS-1/IRS-1, p-PI3K/PI3K, and p-Akt/Akt in hippocampus of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	p-IR/IR	p-IRS-1/IRS-1	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt
对照	—	1.179 ± 0.101	60.63 ± 22.93	1.556 ± 0.058	0.901 ± 0.117
模型	—	0.543 ± 0.094**	138.00 ± 18.06**	1.287 ± 0.141**	0.749 ± 0.060*
阳性药 (二甲双胍 + 氟西汀)	0.18 + 0.001 8	0.993 ± 0.151 [#]	101.13 ± 26.24 [#]	1.604 ± 0.152 [#]	0.884 ± 0.131 [#]
左归降糖解郁方	10.26	0.582 ± 0.089	124.38 ± 20.96	1.252 ± 0.140	0.704 ± 0.103
	20.52	1.086 ± 0.082 [#]	110.13 ± 21.79 [#]	1.450 ± 1.067 [#]	0.869 ± 0.098 [#]

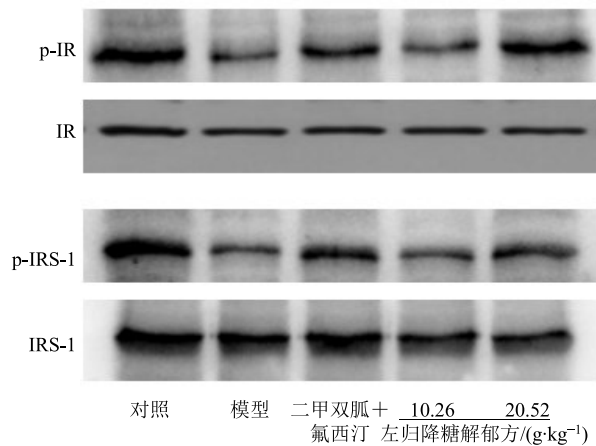


图 3 各组大鼠海马 p-IR、IR、p-IRS-1、IRS-1 蛋白表达
Fig. 3 Protein expression of p-IR, IR, p-IRS-1, and IRS-1 in hippocampus of rats in each group

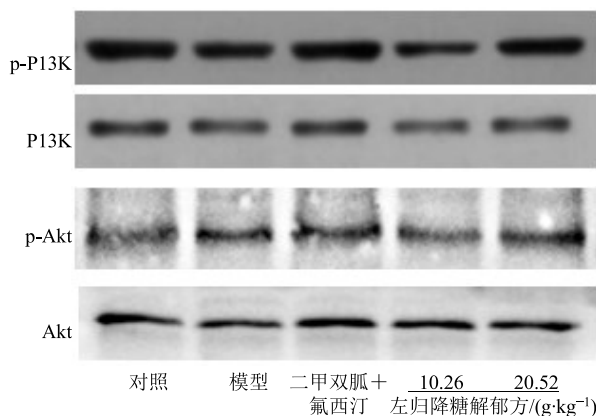


图 4 各组大鼠海马 p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt 蛋白表达
Fig. 4 Protein expression of p-PI3K, PI3K, p-Akt, and Akt in hippocampus of rats in each group

表达, 且其磷酸化异常可通过影响脑内能量代谢和基因表达造成脑功能障碍^[11]。本实验通过免疫荧光检测发现, 糖尿病并发抑郁症大鼠海马 CA3 区中的 p-IR 和 p-IRS-1 表达显著降低, 并推测糖尿病并发抑郁症大鼠海马存在海马胰岛素受体后水平异常^[4]。而给予左归降糖解郁方后, 模型大鼠海马 p-IR 和 p-IRS-1 表达显著升高, 提示左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠海马的胰岛素信号具有一定的调节作用。

IRS-1 的 C-末端酪氨酸残基自身磷酸化被激活后, 能够与含有 SH-2 结构域的 PI3K 结合, 然后活化下游靶分子, PI3K/Akt 通路即为胰岛素信号的经典下游通路。本实验中, 左归降糖解郁方可有效逆转糖尿病并发抑郁症大鼠海马中降低的 PI3K 和 Akt 磷酸化水平。海马中的 PI3K 信号通路可通过多种途径参与机体情绪的调节, 而且对于能量代谢等也发挥了重要作用。首先, 胰岛素信号可通过 PI3K/Akt 途径增强细胞表面多巴胺转运体的表达而改变多巴胺含量, 并影响情绪和代谢变化^[12]。多巴胺系统是机体代谢状态和情绪行为的关键整合者, 其既可通过控制食欲或奖赏性进食行为调节能量代谢^[13], 又可调节包括快感缺失、运动行为迟缓、疲劳等在内的多种关键抑郁症状。

其次, PI3K/Akt 途径可通过激活 mTOR, 直接调节细胞线粒体的代谢、神经发生和突触可塑性。前期研究也发现, 左归降糖解郁方不仅可降低糖尿病并发抑郁症大鼠海马神经元微小兴奋性突触后电流^[14], 同时还可显著性调节海马的突触可塑性相

关蛋白^[15]。最后, PI3K/Akt 途径还可通过促进糖原合成酶 3 (GSK-3) 的 serine-9/21 磷酸化而抑制 GSK-3 活性^[16]。中枢神经系统中 GSK-3 水平升高与大鼠抑郁样行为密切相关^[17], 而抑制其在海马中的表达活性可产生抗抑郁效果^[18]。据此认为, 左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症模型大鼠行为的干预作用, 与其调节大鼠海马胰岛素信号有关。但是其具体又是通过何种下游信号通路发挥作用还需要进一步实验研究。此外, 由于中枢胰岛素信号可间接调节能量代谢及进食量等过程, 故推测本方调节中枢胰岛素信号可能也参与了其对外周代谢的控制作用, 但相关推测仍有待验证。

综上所述, 本实验表明, 左归降糖解郁方具有较好的调节外周血糖和改善动物抑郁行为的双重作用, 该作用可能与其调节大鼠海马胰岛素信号通路, 改善脑内胰岛素抵抗有关。

参考文献

- [1] Mommersteeg P M C, Herr R, Pouwer F, *et al.* The association between diabetes and an episode of depressive symptoms in the 2002 World Health Survey: An analysis of 231, 797 individuals from 47 countries [J]. *Diabet Med*, 2013, 30(6): 208-214.
- [2] Goldstein S, Naglieri J A. *Encyclopedia of Child Behavior and Development* [M]. Boston: Springer, 2011.
- [3] Darwish L, Beroncal E, Sison M V, *et al.* Depression in people with type 2 diabetes: Current perspectives [J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2018, 11: 333-343.
- [4] 朱责梅, 杨丝丝, 伍迪, 等. 胰岛素抵抗与糖尿病脑病 [J]. *生理科学进展*, 2016, 47(5): 395-400.
- [5] Silva N L E, Lam M P, Soares C N, *et al.* Insulin resistance as a shared pathogenic mechanism between depression and type 2 diabetes [J]. *Front Psych*, 2019. doi: 10.3389/fpsy.2019.00057.
- [6] Yang H, Li W, Meng P, *et al.* Chronic unpredictable mild stress aggravates mood disorder, cognitive impairment, and brain insulin resistance in diabetic rat [J]. *Evid Based Compl Alt Med*, 2018, doi: 10.1155/2018/2901863.
- [7] Wang Y, Yang H, Li W, *et al.* Zuogui Jiangtang Jieyu formulation prevents hyperglycaemia and depressive-like behaviour in rats by reducing the glucocorticoid level in plasma and hippocampus [J]. *Evid Based Compl Alt Med*, 2015, doi: 10.1155/2015/158361.
- [8] 杨蕙, 杜青, 赵洪庆, 等. 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 [J]. *中草药*, 2015, 46(21): 3214-3218.
- [9] Garcia B G, Wei Y, Moron J A, *et al.* Akt is essential for insulin modulation of amphetamine induced human dopamine transporter cell-surface redistribution [J]. *Mol Pharmacol*, 2005, 68(1): 102-109.
- [10] 刘检, 刘林, 唐林, 等. 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 [J]. *中草药*, 2019, 50(10): 2420-2427.
- [11] 蔺晓源, 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.
- [12] Baskin D G, Schwartz M W, Sipols A J, *et al.* Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) expression in rat brain [J]. *Endocrinology*, 1994, 134(4): 1952-1955.
- [13] Palmiter R D. Is dopamine a physiologically relevant mediator of feeding behavior? [J]. *Trends Neurosci*, 2007, 30(8): 375-381.
- [14] 吴梦瑶, 向韵, 韩远山, 等. 左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠海马神经元微小兴奋性突触后电流的影响 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2018, 25(8): 48-52.
- [15] 杜青, 赵洪庆, 王宇红, 等. 左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症模型大鼠海马神经突触功能可塑性相关蛋白的影响 [J]. *中国现代应用药学*, 2016, 33(5): 521-525.
- [16] Beurel E, Grieco S F, Jope R S. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): Regulation, actions, and diseases [J]. *Pharmacol Ther*, 2015, doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.11.016.
- [17] Jope R S. Glycogen synthase kinase-3 in the etiology and treatment of mood disorders [J]. *Front Mol Neurosci*, 2011, doi: 10.3389/fnmol.2011.00016.
- [18] Kaidanovich-Beilin O, Milman A, Weizman A, *et al.* Rapid antidepressant-like activity of specific glycogen synthase kinase-3 inhibitor and its effect on β -catenin in mouse hippocampus [J]. *Biol Psych*, 2004, 55(8): 781-784.