

# 左归降糖解郁方改善糖尿病并发抑郁症大鼠 *N*-甲基 *D*-天冬氨酸受体过激致海马突触损伤的作用机制

刘洋<sup>1</sup>, 李萍<sup>1</sup>, 杨蕙<sup>3</sup>, 邹蔓姝<sup>1</sup>, 赵洪庆<sup>1</sup>, 郭海鹏<sup>1</sup>, 王婷婷<sup>1</sup>, 王华<sup>3</sup>, 王宇红<sup>1,2\*</sup>

1. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208

2. 抑郁类疾病中医药防治湖南省重点实验室, 湖南长沙 410208

3. 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通过调节吲哚胺-2,3-双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase1, IDO)信号抑制糖尿病并发抑郁症大鼠海马 *N*-甲基 *D*-天冬氨酸受体(*N*-methyl *D*-aspartate receptor, NR)过激致海马突触损伤的作用机制。方法 建立糖尿病并发抑郁症大鼠模型,并随机分为空白组、模型组、IDO抑制剂(3 mg/kg)组、左归降糖解郁方(20.52 g/kg)组和阳性对照(二甲双胍 0.18 g/kg+氟西汀 1.8 mg/kg)组。各组大鼠 ig 给药 28 d 后,采用旷场实验、强迫游泳实验和 Morris 水迷宫检测大鼠抑郁样行为和记忆认知功能;采用 Western blotting 和 qRT-PCR 检测海马 IDO 蛋白和基因表达;采用 ELISA 试剂盒检测血清和海马中  $\gamma$ -干扰素(interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )、CC 趋化因子配体 2(CC chemokine ligand 2, CCL2)、色氨酸、5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、犬尿氨酸、犬尿喹啉酸(kynurenine acid, KA)、喹啉酸、白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )和 IL-6 水平;采用免疫荧光法检测海马中离子钙接头蛋白-1(ionized calcium binding adaptor molecule-1, Iba-1)、胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)、突触素(synaptophysin, Syn)、突触后致密蛋白-95(post synaptic density protein-95, PSD-95)的表达;采用 Western blotting 检测海马中腺苷 A1R 受体(adenosine A1 receptor, A1R)、腺苷 A2AR 受体(adenosine A2A receptor, A2AR)、腺苷 A3R 受体(adenosine A3 receptor, A3R)、*N*-甲基 *D*-天冬氨酸受体 2A(*N*-methyl *D*-aspartate receptor 2A, NR2A)、*N*-甲基 *D*-天冬氨酸受体 2B(*N*-methyl *D*-aspartate receptor 2B, NR2B)和脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)蛋白表达;采用苏木素-伊红染色、Nissl 染色和 TUNEL 法检测海马病理损伤及凋亡情况。结果 左归降糖解郁方能显著降低模型大鼠血糖水平( $P < 0.01$ ),并改善抑郁样行为,表现为旷场实验总距离和中心时间显著增加( $P < 0.01$ )、强迫游泳不动时间显著缩短( $P < 0.01$ )、Morris 水迷宫实验定位巡航时间显著降低( $P < 0.05$ )和空间探索时间显著增加( $P < 0.01$ )。左归降糖解郁方组和 IDO 抑制剂均能通过显著下调 IDO 蛋白和基因表达( $P < 0.001$ ),并不同程度降低 IFN- $\gamma$ 、CCL2、犬尿氨酸、喹啉酸水平( $P < 0.05$ 、0.01),逆转色氨酸-犬尿氨酸代谢紊乱;同时显著抑制 Iba-1、GFAP 表达( $P < 0.05$ 、0.01),并降低 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平( $P < 0.05$ 、0.01),抑制体内炎症水平;进而降低 A2AR、NR2A、NR2B 蛋白表达( $P < 0.05$ 、0.01),增加 A1R、A3R 蛋白表达( $P < 0.05$ ),改善 NR 过度激活;最终提高 Syn、PSD-95、BDNF 表达( $P < 0.05$ ),显著改善海马病理损伤及降低神经元凋亡( $P < 0.05$ 、0.01),对海马突触损伤和神经元产生保护作用。结论 左归降糖解郁方通过抑制 IDO 水平,调节糖尿病并发抑郁症大鼠海马色氨酸-犬尿氨酸代谢通路,从而改善 NR 过激致海马突触损伤,发挥抗抑郁作用。

**关键词:** 左归降糖解郁方; 糖尿病并发抑郁症; 吲哚胺-2,3-双加氧酶; 色氨酸-犬尿氨酸代谢通路; 海马突触损伤; 马钱苷; 芍药苷; 毛蕊异黄酮苷; 金丝桃苷; 姜黄素; 丹酚酸 B

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)19-6323-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.19.014

## Mechanism of Zuogui Jiangtang Jieyu Formula on improving hippocampal synaptic damage caused by *N*-methyl *D*-aspartate receptor hyperactivity in diabetes with depression rats

LIU Yang<sup>1</sup>, LI Ping<sup>1</sup>, YANG Hui<sup>3</sup>, ZOU Man-shu<sup>1</sup>, ZHAO Hong-qing<sup>1</sup>, GUO Hai-peng<sup>1</sup>, WANG Ting-ting<sup>1</sup>, WANG Hua<sup>3</sup>, WANG Yu-hong<sup>1,2</sup>

收稿日期: 2023-05-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81874464); 国家自然科学基金资助项目(82174357); 湖南省科药联合基金资助项目(2023JJ60476); 湖南省科药联合基金资助项目(2023JJ60482); 湖南省中医药管理局科研课题(B2023141)

作者简介: 刘洋(1998—),男,硕士研究生,研究方向为中药神经药理学。E-mail: 948414284@qq.com

\*通信作者: 王宇红(1965—),女,研究员,博士生导师,研究方向为中药新药。E-mail: wyh107@126.com

1. Huan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China
2. Hunan Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Prevention & Treatment of Depressive Diseases, Changsha 410208, China
3. First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China

**Abstract: Objective** To study the mechanism of Zuogui Jiangtang Jieyu Formula (左归降糖解郁方) on inhibiting hippocampal synaptic damage caused by excessive *N*-methyl *D*-aspartate receptor (NR) in diabetes with depression rats by regulating indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) signal. **Method** Diabetic rats with depression were established and randomly divided into blank group, model group, IDO inhibitor (3 mg/kg) group, Zuogui Jiangtang Jieyu Formula (20.52 g/kg) group and positive control (metformin 0.18 g/kg + fluoxetine 1.8 mg/kg) group. After 28 d of administration, depression-like behavior and memory and cognitive function were detected by open field test, forced swimming test and Morris water maze. Western blotting and qRT-PCR were used to detect the expression levels of IDO protein and mRNA in hippocampus. The contents of interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), CC chemokine ligand 2 (CCL2), tryptophan, 5-hydroxytryptamine (5-HT), kynurenine, kynurenine acid (KA), quinolinic acid, interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and IL-6 in serum and hippocampus were determined by ELISA. The expressions of ionized calcium binding adaptor molecule-1 (Iba-1), glial fibrillary acidic protein (GFAP), synaptophysin (Syn) and post synaptic density protein-95 (PSD-95) in hippocampus were detected by immunofluorescence assay. Protein expressions of adenosine A1 receptor (A1R), adenosine A2AR receptor (A2AR), adenosine A3 receptor (A3R), *N*-methyl *D*-aspartate receptor 2A (NR2A), *N*-methyl *D*-aspartate receptor 2B (NR2B) and brain derived neurotrophic factor (BDNF) in hippocampus were detected by Western blotting. Hematoxylin-eosin (HE), Nissl and TUNEL were used to detect the pathological injury and apoptosis of hippocampus. **Results** Zuogui Jiangtang Jieyu Formula significantly reduced blood sugar level and improved depression-like behavior in model rats ( $P < 0.01$ ). The results showed that the total distance and center time of open field experiment were significantly increased ( $P < 0.01$ ), the immobile time of forced swimming was significantly shortened ( $P < 0.01$ ), the positioning cruise time of Morris water maze experiment was significantly decreased ( $P < 0.05$ ), and the space exploration time was significantly increased ( $P < 0.01$ ). Both Zuogui Jiangtang Jieyu Formula group and IDO inhibitor group could significantly down-regulate IDO protein and transcription levels ( $P < 0.001$ ), and reduce IFN- $\gamma$ , CCL2, kynurenine, quinolinic acid levels to varying degrees ( $P < 0.05, 0.01$ ), and reverse tryptophan-kynurenine metabolic disorders. At the same time, the expressions of Iba-1 and GFAP were significantly inhibited ( $P < 0.05, 0.01$ ), and the levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 were decreased ( $P < 0.05, 0.01$ ), and the levels of inflammation *in vivo* were inhibited. Furthermore, the protein expression levels of A2AR, NR2A and NR2B were decreased ( $P < 0.05, 0.01$ ), and the protein expression levels of A1R and A3R were increased ( $P < 0.05$ ) to improve the over-activation of NR. Finally, the expression levels of Syn, PSD-95 and BDNF were increased ( $P < 0.05$ ), and the pathological injury of hippocampus was significantly improved and the apoptosis of neurons was decreased ( $P < 0.05, 0.01$ ), which had a protective effect on the damage of hippocampus synapses and neurons. **Conclusion** Zuogui Jiangtang Jieyu Formula can effectively regulate the hippocampal tryptophan-kynurenine metabolic pathway in diabetic rats complicated with depression by inhibiting IDO level, so as to improve the hippocampal synaptic damage caused by NR overreaction and exert an antidepressant effect.

**Key words:** Zuogui Jiangtang Jieyu Formula; diabetes with depression; indoleamine 2,3-dioxygenase; tryptophan-kynurenine metabolic pathway; hippocampal synaptic damage; loganin; paeoniflorin; calycosin-7-glucoside; hyperoside; curcumin; salvianolic acid B

糖尿病是全球患病率增长最快的慢性疾病之一，根据世界卫生组织的数据，2019 年全球有超过 4.63 亿人患有糖尿病，到 2045 年患者人数将增加到 7.02 亿<sup>[1-2]</sup>。中国糖尿病患者抑郁患病率为 25.9%<sup>[3]</sup>。糖尿病合并抑郁症主要表现为情绪低落、记忆和认知功能下降、睡眠障碍等症状。抑郁症状的产生不利于患者血糖控制，极大降低了生活质量和治疗依从性<sup>[3]</sup>。但糖尿病并发抑郁的发病机制至今未明。

最新研究表明，色氨酸-犬尿氨酸代谢通路可能

是糖尿病和抑郁症共有发病机制<sup>[4-5]</sup>，其中色氨酸代谢物参与了糖尿病合并抑郁症的发生。色氨酸是一种必需氨基酸，在体内大部分通过吲哚胺-2,3-双加氧酶 (indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO) 催化为犬尿氨酸，而小部分可转化为 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT)。当色氨酸-犬尿氨酸代谢亢进时，体内 5-HT 合成减少，易促进抑郁症的发生。IDO 是色氨酸-犬尿氨酸代谢通路的关键限速酶，而  $\gamma$ -干扰素 (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) 和 CC 族趋化因子配体 2 (CC chemokine ligand 2, CCL2) 是

IDO 最强激动剂<sup>[6]</sup>, 研究显示, 糖尿病患者血清中 IFN- $\gamma$ 、CCL2 分泌增多<sup>[7]</sup>, 可激活犬尿氨酸通路, 直接导致犬尿氨酸生成增多<sup>[8]</sup>, 并进入小胶质细胞和星形胶质细胞中进行代谢<sup>[9]</sup>。在小胶质细胞中, 犬尿氨酸经犬尿氨酸-3-羟化酶、犬尿氨酸酶、3-羟基邻氨基苯甲酸(3-hydroxyanthranilic acid, 3-HAA) 氧化酶系列催化反应, 生成喹啉酸; 而在星形胶质细胞中, 犬尿氨酸则在犬尿氨酸转氨酶作用下生成犬尿喹啉酸(kynurenine acid, KA)。然而, 色氨酸代谢平衡将在病理/压力条件下被打破。在糖尿病患者中倾向于向喹啉酸途径代谢<sup>[4]</sup>。而喹啉酸为 *N*-甲基 *D*-天冬氨酸受体 (*N*-methyl *D*-aspartate receptor, NR) 强激动剂, 具有明确的神经兴奋毒性, 可促进神经元突触损伤和凋亡, 诱发抑郁症的产生<sup>[10]</sup>。

左归降糖解郁方以《景岳全书》左归丸为基础化裁而成(专利号 CN101816766A)。课题组前期研究发现, 糖尿病并发抑郁症大鼠海马中存在色氨酸-犬尿氨酸代谢通路异常, 并且左归降糖解郁方对该通路其有改善作用<sup>[11]</sup>。但其如何通过调节 IDO 信号, 改善色氨酸-犬尿氨酸代谢通路, 进而抑制 NR 过度激活致海马突触损伤的作用机制尚不明确。故本研究拟进行在体动物实验, 采用 IDO 抑制剂 1-甲基-*L*-色氨酸(1-methyl-*L*-tryptophan, 1-MT) 作为机制研究对照组, 进一步明确左归降糖解郁方对 IDO 信号的调控作用, 从而改善 NR 过激致海马突触损伤的作用机制, 为其临床应用提供参考。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 50 只, 体质量 200~220 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司 [SCXK(湘)2019-0004], 并饲养于湖南中医药大学实验动物中心 SPF 级动物房 [SYXK(湘)2019-0009]。动物实验通过湖南中医药大学实验动物伦理委员会审查(批准号 LLBH-202206020003)。

### 1.2 药材

左归降糖解郁方由熟地黄 15 g、山茱萸 12 g、枸杞子 12 g、菟丝子 9 g、贯叶金丝桃 3 g、丹参 12 g、牡丹皮 6 g、姜黄 9 g、牛膝 9 g、杜仲 9 g、黄芪 18 g 组成, 以上饮片均购自湖南中医药大学第一附属医院, 经湖南中医药大学王宇红研究员分别鉴定为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的块根经加工蒸晒而成、山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果肉、茄科植物

宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L. 的干燥成熟果实、旋花科植物菟丝子 *Cuscuta chinensis* Lam. 的干燥成熟种子、藤黄科植物贯叶金丝桃 *Hypericum perforatum* L. 的干燥地上部分、唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎、毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮、姜科植物姜黄 *Curcuma Longa* L. 的干燥根茎、苋科植物牛膝 *Achyranthes bidentata* Bl. 的干燥根、杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的干燥树皮、豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根, 均符合《中国药典》2020 年版规定。

### 1.3 药品与试剂

盐酸二甲双胍片(批号 2005242, 规格 0.25 g/片) 购自湖南湘雅制药有限公司; 盐酸氟西汀胶囊(百忧解, 批号 6914X, 20 mg/粒) 购自法国 Patheon; 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ, 批号 1019C072, 100 mg/支) 购自北京索莱宝科技有限公司; IDO 抑制剂 1-MT(批号 452483) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; IDO 抗体(批号 13268-1-AP)、脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF) 抗体(批号 28205-1-AP)、腺苷 A2a 受体(adenosine A2a receptor, A2AR) 抗体(批号 51092-1-AP)、*N*-甲基 *D*-天冬氨酸受体 2A (*N*-methyl *D*-aspartate receptor 2A, NR2A) 抗体(批号 28525-1-AP)、*N*-甲基 *D*-天冬氨酸受体 2B (*N*-methyl *D*-aspartate receptor 2B, NR2B) 抗体(批号 21920-1-AP)、突触素(synaptophysin, Syn) 抗体(批号 20258-1-AP)、胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP) 抗体(批号 16825-1-AP) 购自武汉三鹰生物技术有限公司; 腺苷 A1R 抗体(批号 A5219)、突触后致密蛋白-95(post synaptic density protein-95, PSD-95) 抗体(批号 A6194) 购自 Abclonal 公司; 腺苷 A3R 受体(adenosine A2a receptor, A3R) 抗体(批号 ab203298) 购自英国 Abcam 公司; 离子钙接头蛋白-1(ionized calcium binding adaptor molecule-1, Iba-1) 抗体(批号 CY7217) 购自 Abways 公司; FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体(批号 PN0083)、CY3 标记山羊抗大鼠 IgG 抗体(批号 PN0052) 购自武汉皮诺飞生物科技有限公司; IFN- $\gamma$  检测试剂盒(批号 2303R06)、CCL2 检测试剂盒(批号 2303R07)、色氨酸检测试剂盒(批号 2303R09)、5-HT 检测试剂盒(批号 2211R37)、犬尿氨酸检测试

剂盒(批号 2303R15)、KA 检测试剂盒(批号 2303R13)、喹啉酸检测试剂盒(批号 2303R07)、白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )检测试剂盒(批号 2211R53)、IL-6 检测试剂盒(批号 2211R60)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )检测试剂盒(批号 2211R56)均购自江苏菲亚生物公司; TUNEL 试剂盒(批号 11684817919)购自瑞士 Roche 公司; 逆转录试剂盒(批号 E047-01B)、qPCR 扩增试剂盒(E096-01A)购自苏州近岸蛋白质科技股份有限公司; 引物由上海生工公司合成。

## 1.4 仪器

$\mu$ Lite+ 型超微量核酸蛋白测定仪(英国 BioDrop 公司); Mini Trans-Blot 蛋白转印系统、ChemiDoc XRS+ 型凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司); DMi8A 型倒置光学显微镜(德国 Leica 公司); MK3 型多功能酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

## 2 方法

### 2.1 左归降糖解郁方的制备

左归降糖解郁方按照课题组方法制成生药质量浓度为 1.14 g/mL 的水煎剂, 采用 UPLC-Q-TOF-MS 共鉴定出化合物 57 个, 其中含马钱苷 3.48 mg/mL、芍药苷 2.05 mg/mL、毛蕊异黄酮苷 3.85 mg/mL、金丝桃苷 2.12 mg/mL、姜黄素 2.58 mg/mL、丹酚酸 B 1.05 mg/mL<sup>[12-13]</sup>。由于课题组前期研究发现高剂量(相当于临床 2 倍剂量)药效效果最佳<sup>[14]</sup>, 故本实验设定左归降糖解郁方组大鼠给药剂量为 20.52 g/kg。

### 2.2 分组与给药

参考文献方法<sup>[13,15]</sup>建立糖尿病并发抑郁症大鼠模型。大鼠给予 4 周高脂饲料喂养后, 采取尾 iv STZ (38 mg/kg), 筛选出空腹血糖  $\geq 16.00$  mmol/L 的糖尿病大鼠并进行 28 d 慢性温和不可预知性应激, 建立糖尿病并发抑郁症大鼠模型。模型大鼠随机分为模型组、IDO 抑制剂组、左归降糖解郁方组和阳性对照组, 每组 10 只, 另取 10 只正常大鼠作为空白组。阳性对照组 ig 二甲双胍 (0.18 g/kg) 联合氟西汀 (1.8 mg/kg), 左归降糖解郁方组 ig 左归降糖解郁方 (20.52 g/kg), 空白组和模型组 ig 等体积蒸馏水 (10 mL/kg), IDO 抑制剂组按照文献方法<sup>[16]</sup> ip 1-MT (3 mg/kg), 各组连续给药 28 d (给药与慢性应激同时进行)。

### 2.3 空腹血糖检测

大鼠提前禁食 12 h, 使用采血针刺破大鼠尾部

血管, 待检测试纸毛细管充满血液后, 插入血糖仪测其空腹血糖。

## 2.4 行为学实验

给药 28 d 后, 进行行为学实验。

**2.4.1 旷场实验** 装置为 1 个 100 cm  $\times$  100 cm  $\times$  40 cm 的箱盒, 底部分为 25 个正方形, 中间 9 个正方形为中心区, 外围 16 个正方形为外周区。将大鼠置于装置中央, 让其自由探索 5 min。通过视频跟踪软件记录在总距离和中心区域时间。

**2.4.2 强迫游泳** 将大鼠单独置于高 50 cm、直径 30 cm 的透明圆筒中, 在 (24  $\pm$  1)  $^{\circ}$ C 条件下灌满 35 cm 深的水。所有大鼠均被强制游泳 6 min, 并在随后的 4 min 内记录静止时间。圆筒之间用黑色板子隔开, 避免相互干扰。

**2.4.3 Morris 水迷宫** 水迷宫为 1 个椭圆形水池, 分成 4 个象限。适应性训练期间, 大鼠连续 4 d 从不同象限被放入水池中, 以训练其找到水下平台, 其中平台的位置保持不变。第 5 天时, 进行定位巡航实验, 将动物从第 1 象限放入水中, 记录 60 s 内找到平台的时间。第 6 天时, 进行空间探索实验, 撤去水下平台, 将动物从第 1 象限放入水中, 记录 60 s 内大鼠在原平台所在象限中的停留游泳时间。

## 2.5 样本收集与处理

在行为学实验结束后, 大鼠 ip 1% 戊巴比妥钠麻醉, 进行主动脉采血。采血完成后, 一部分经心脏灌注生理盐水和多聚甲醛后, 分离脑组织于 4% 多聚甲醛溶液中保存, 用于病理及免疫荧光检测。一部分直接在冰上分离海马组织, 于液氮中速冻, 转移至 -80  $^{\circ}$ C 超低温冰箱保存, 用于 ELISA、Western blotting、qRT-PCR 检测。血样经 4  $^{\circ}$ C、3000 r/min 离心 15 min 后, 取上清于 -80  $^{\circ}$ C 保存。

## 2.6 海马组织病理学观察

取多聚甲醛充分固定的大鼠脑组织, 梯度乙醇脱水, 石蜡包埋, 以 5  $\mu$ m 厚度连续切片, 采用苏木素-伊红 (HE) 试剂盒或 Nissl 染色盒进行染色, 完成后将切片固定于载玻片上, 中性树脂封片, 在显微镜下对海马组织进行拍照, 并观察各组大鼠海马组织病理学改变、神经元及神经元中尼氏小体的形态及数量变化。

**2.7 ELISA 检测血清、海马中 IFN- $\gamma$ 、CCL2、色氨酸、5-HT、犬尿氨酸、KA、喹啉酸、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-6 的含量**

按照 ELISA 试剂盒说明书检测大鼠血清、海马

中 IFN- $\gamma$ 、CCL2、色氨酸、5-HT、犬尿氨酸、KA、喹啉酸、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 的含量。

## 2.8 Western blotting 检测海马组织 IDO、A1R、A2AR、A3R、NR2A、NR2B 和 BDNF 蛋白表达

取各组大鼠海马组织，加入含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液，提取总蛋白，采用 BCA 法定量蛋白浓度并归一化。蛋白样本进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，并转膜至 PVDF 膜，于 5% 脱脂牛奶中室温封闭 2 h。加入相应一抗 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。经 PBST 漂洗 3 次后，加入二抗，于室温下摇床孵育 2 h。PBST 漂洗 3 次后，采用 ECL 显色法显影，并使用全自动凝胶成像系统进行成像，使用 Image J 软件计算条带灰度值。

## 2.9 qRT-PCR 检测海马组织 IDO 基因表达

使用 Trizol 法提取海马中总 RNA，经检测含量及质量合格后，使用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。采用 qPCR 扩增试剂盒加入目的基因上、下游引物，扩增目的基因。每个样本重复 3 次，以 GAPDH 基因为内参， $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法分析各基因 mRNA 的相对表达水平。引物序列：IDO 上游引物 5'-AGAGGATGCGTACTTCGTG-3'，下游引物 5'-TTTTTGGGGTGTCCAGAC-3'；GAPDH 上游引物 5'-GCCTGGAGAAACCTGCCAA-3'，下游引物 5'-ACAGGAGACAACCTGGTCCT-3'。

## 2.10 免疫荧光法检测海马中小胶质细胞标志物 Iba-1、星形胶质细胞标志物 GFAP、海马突触前膜标志蛋白 Syn 和突触后膜标志蛋白 PSD-95 表达

取多聚甲醛充分固定的大鼠脑组织，包埋，切片，脱蜡，脱水，抗原修复，用 10% 牛血清白蛋白封闭 30 min，加入对应一抗，于湿盒内 4  $^{\circ}$ C 过夜。PBS 漂洗 4 次，滴加荧光标记的二抗，并室温孵育 1 h。PBS 漂洗 4 次，使用 DAPI 工作液，室温避光孵育 20 min，用抗荧光猝灭剂进行封片，荧光显微镜下观察和采集图像，使用 Image J 软件计算平均荧光强度。

## 2.11 TUNEL 检测海马神经元凋亡情况

取大鼠脑组织切片，脱蜡后按照 TUNEL 染色试剂盒说明书进行染色，抗荧光猝灭剂封片，荧光显微镜下采集图像，使用 Image J 软件计算阳性细胞数量。

## 2.12 统计学分析

使用 SPSS 21.0 软件对数据进行统计，数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间比较采用单因素方差分析 (One-

way ANOVA)，两两比较方差齐时采用 Turkey 检验，方差不齐时采用 Dunnett's T3 检验。

## 3 结果

### 3.1 左归降糖解郁方改善糖尿病并发抑郁症大鼠血糖水平及抑郁样行为

如图 1-A、B 所示，与空白组比较，在使用高脂饲料喂养联合 STZ 注射诱导后，大鼠空腹血糖均显著升高 ( $P < 0.001$ )，符合糖尿病疾病模型特征；与模型组比较，阳性对照组第 4 周血糖开始显著降低 ( $P < 0.05$ )，而左归降糖解郁方组第 5 周血糖开始显著降低 ( $P < 0.05$ )。经 6 周药物干预后，左归降糖解郁方组及阳性对照组大鼠空腹血糖均显著降低 ( $P < 0.01$ )，而 IDO 抑制剂组大鼠血糖无显著变化。表明左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠血糖水平具有改善作用。

如图 1-C~F 所示，与空白组比较，模型组大鼠在旷场实验中的总距离及中心区域时间显著下降 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ )，在强迫游泳实验中不动时间显著增加 ( $P < 0.01$ )，呈现明显抑郁样行为；与模型组比较，各给药组抑郁样行为均有显著改善，其中 IDO 抑制剂组、左归降糖解郁方组、阳性对照组大鼠在旷场实验中总距离显著增加 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )，中心区域时间延长 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ )，强迫游泳不动时间显著减少 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。表明左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠的抑郁样行为具有明显改善作用。

### 3.2 左归降糖解郁方改善糖尿病合并抑郁症大鼠的学习和记忆功能

如图 2 所示，与空白组比较，模型组大鼠的定位巡航时间显著增加 ( $P < 0.05$ )，空间探索时间显著减少 ( $P < 0.01$ )，学习和记忆能力明显下降；与模型组比较，左归降糖解郁方及阳性对照组定位巡航时间显著减少 ( $P < 0.05$ )，空间探索时间显著增加 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )，而 IDO 抑制剂组无显著变化。表明左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠学习和记忆能力具有改善作用。

### 3.3 左归降糖解郁方下调糖尿病合并抑郁症大鼠海马 IDO 表达

如图 3-A~C 所示，与空白组比较，模型组大鼠海马中 IDO 蛋白和 mRNA 表达水平均显著上升 ( $P < 0.01$ )；与模型组比较，左归降糖解郁方组与 IDO 抑制剂组均能显著逆转糖尿病合并抑郁症大鼠海马中 IDO 蛋白和 mRNA 表达水平 ( $P < 0.001$ )。

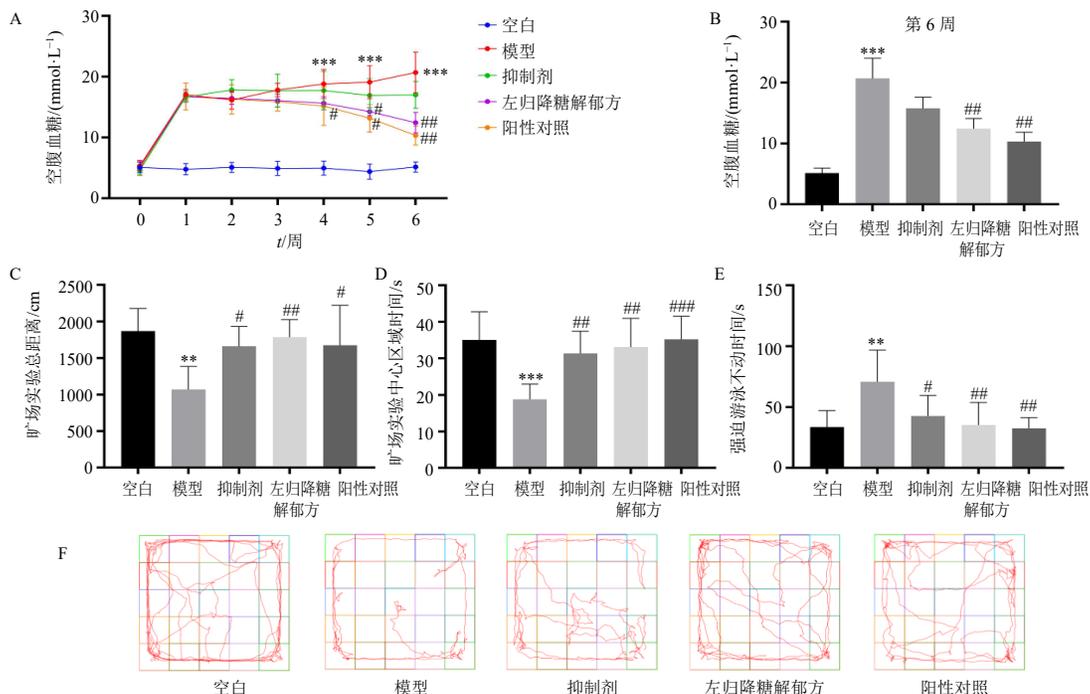


图1 左归降糖解郁方对糖尿病合并抑郁症大鼠血糖和抑郁样行为的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )  
 A-空腹血糖水平 B-第6周大鼠空腹血糖水平 C-旷场实验总距离 D-旷场实验中心区域时间 E-强迫游泳不动时间 F-旷场实验代表性轨迹  
 与空白组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$ , 下图同  
 A-fasting blood glucose level B-fasting blood glucose level at 6th week C-total distance in open-field test D-center time in open-field test E-immobile time in forced swimming test F-representative trajectories of open field experiments \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs blank group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$  vs model group, same as below figures

图1 左归降糖解郁方对糖尿病合并抑郁症大鼠血糖和抑郁样行为的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 1 Effect of Zuogui Jiangtang Jieyu Formula on blood glucose and depression-like behaviors in diabetes with depression rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

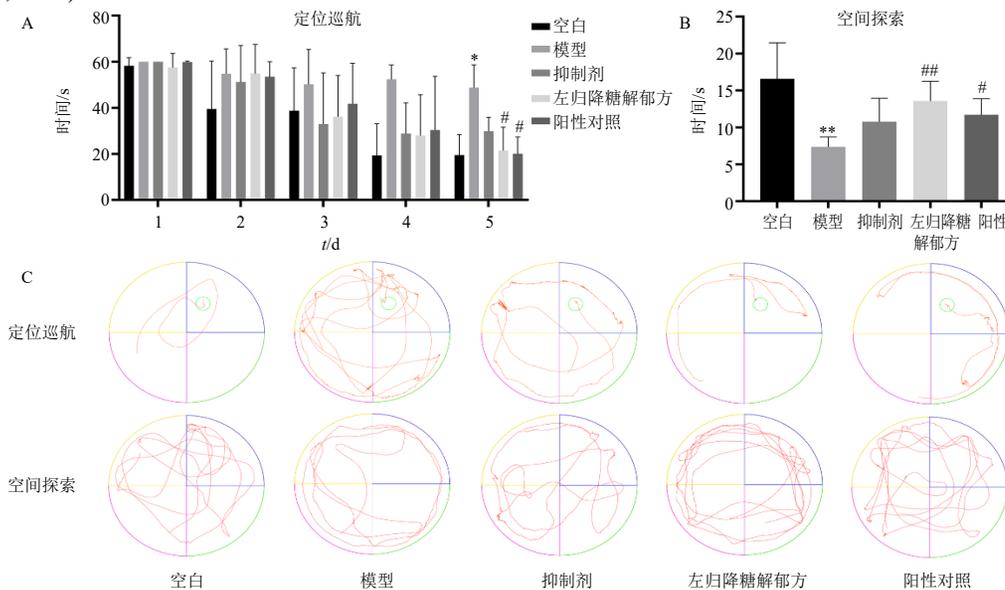
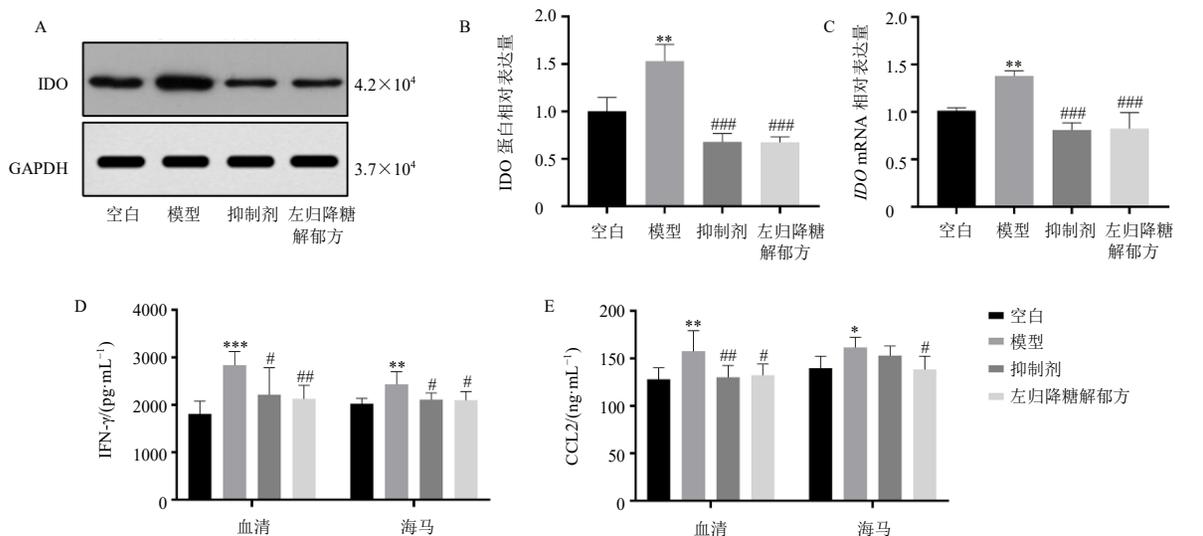


图2 左归降糖解郁方对糖尿病合并抑郁症大鼠学习和记忆功能的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )  
 A-Morris 水迷宫中大鼠到达指定平台时间 B-Morris 水迷宫中大鼠在目标象限中停留时间 C-Morris 水迷宫中代表性轨迹  
 A-time of arrive at the target platform in Morris water maze B-time of residence in the target quadrant in Morris water maze C-representative trajectories of Morris water maze

图2 左归降糖解郁方对糖尿病合并抑郁症大鼠学习和记忆功能的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 2 Effect of Zuogui Jiangtang Jieyu Formula on learning and memory function in diabetes with depression rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )



A-Western blotting 检测海马中 IDO 蛋白表达 B-定量海马中 IDO 蛋白表达 (n=3) C-qRT-PCR 定量海马中 IDO mRNA 表达水平 (n=3) D、E-ELISA 检测血清及海马中 IFN- $\gamma$ 、CCL2 水平 (血清 n=8, 海马 n=5) A-IDO protein expression in hippocampus by Western blotting B-quantification of IDO protein expression in hippocampus (n=3) C-quantification of IDO mRNA expression in hippocampus by qRT-PCR (n=3) D, E-levels of IFN- $\gamma$  and CCL2 in serum and hippocampus by ELISA (serum n=8, hippocampus n=5)

图 3 左归降糖解郁方对糖尿病合并抑郁症大鼠海马 IDO 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Fig. 3 Effect of Zuogui Jiangtang Jieyu Formula on IDO expression in hippocampus of diabetes with depression rats ( $\bar{x} \pm s$ )

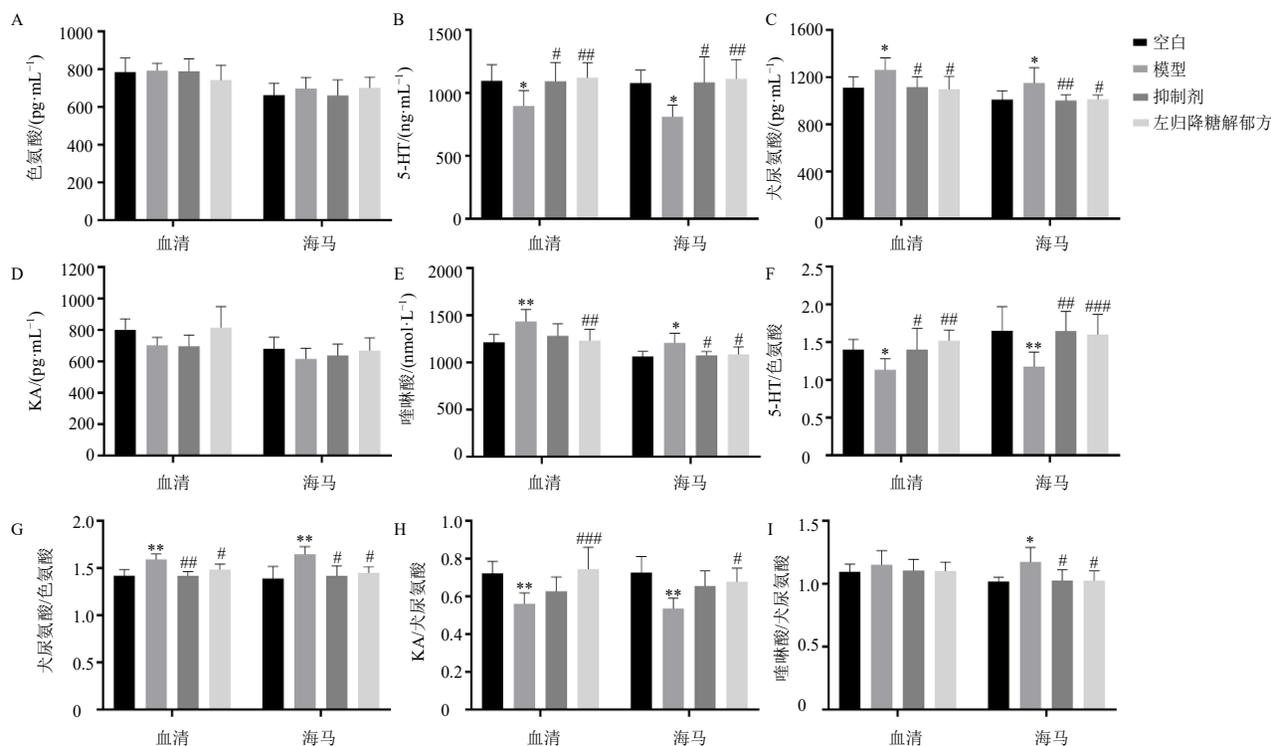
由于 IFN- $\gamma$ 、CCL2 可显著增加 IDO 表达，同时检测了血清和海马中 IFN- $\gamma$ 、CCL2 水平。如图 3-D、E 所示，与空白组比较，模型组大鼠血清和海马中 IFN- $\gamma$ 、CCL2 水平显著上升 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ )；与模型组比较，左归降糖解郁方组显著下调血清和海马中 IFN- $\gamma$ 、CCL2 水平 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。IDO 抑制剂组显著下调血清中 IFN- $\gamma$ 、CCL2 水平及海马中 IFN- $\gamma$  水平 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )，但对海马中 CCL2 水平无显著性差异，这与其他研究使用 1-MT 来抑制外周和中枢中炎症以改善抑郁样行为结果相似。表明左归降糖解郁方能下调糖尿病并发抑郁症大鼠海马中 IDO 表达。

### 3.4 左归降糖解郁方逆转糖尿病合并抑郁症大鼠海马色氨酸-犬尿氨酸代谢通路

色氨酸在体内主要代谢途径有 2 条，一是在 IDO 作用下生成犬尿氨酸，二是生成 5-HT。本研究检测了大鼠血清和海马中色氨酸、5-HT、犬尿氨酸水平。如图 4-A~C 所示，各组大鼠血清和海马中色氨酸水平均无显著变化。与空白组比较，模型组血清和海马中 5-HT 显著下降 ( $P < 0.05$ )，犬尿氨酸显著上升 ( $P < 0.05$ )；与模型组比较，左归降糖解郁方组和 IDO 抑制剂组均能显著逆转血清和海马中 5-HT、犬尿氨酸水平 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。为进一

步评价色氨酸代谢倾向，计算了 5-HT/色氨酸、犬尿氨酸/色氨酸值。如图 4-F、G 所示，发现在模型组中，色氨酸代谢通路以犬尿氨酸途径为主，相反 IDO 抑制剂组和左归降糖解郁方组以 5-HT 途径为主，从而提高 5-HT 水平。表明左归降糖解郁方能逆转糖尿病并发抑郁症大鼠海马中色氨酸代谢通路，促进 5-HT 的生成。

另外，犬尿氨酸代谢通路也主要有 2 条通路，在小胶质细胞中，犬尿氨酸经犬尿氨酸-3-羟化酶、犬尿氨酸酶、3-HAA 氧化酶系列催化反应，生成喹啉酸；而在星形胶质细胞中，犬尿氨酸则在犬尿氨酸转氨酶作用下生成 KA。如图 4-D、E 所示，各组 KA 水平均无显著变化。与空白组比较，模型组血清和海马中喹啉酸显著上升 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )；与模型组比较，左归降糖解郁方组血清和海马中喹啉酸水平显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )，IDO 抑制剂组海马中喹啉酸水平显著降低 ( $P < 0.05$ )。同样，进一步评价了犬尿氨酸代谢倾向，计算了 KA/犬尿氨酸、喹啉酸/犬尿氨酸值。如图 4-H、I 所示，发现在模型组中，犬尿氨酸代谢通路以喹啉酸途径为主，相反 IDO 抑制剂组和左归降糖解郁方组以 KA 途径为主。表明左归降糖解郁方能逆转糖尿病并发抑郁症大鼠海马中犬尿氨酸代谢通路，减少喹啉酸生成。



A-色氨酸水平 B-5-HT水平 C-犬尿氨酸水平 D-KA水平 E-喹啉酸水平 F-5-HT/色氨酸水平 G-犬尿氨酸/色氨酸水平 H-KA/犬尿氨酸水平 I-喹啉酸/犬尿氨酸水平 (血清  $n=8$ , 海马  $n=5$ )

A-tryptophan level B-5-HT level C-kynurenine level D-KA level E-quinolinic acid level F-5-HT/tryptophan level G-kynurenine/tryptophan level H-KA/kynurenine level I-quinolinic acid/kynurenine level (serum  $n=8$ , hippocampus  $n=5$ )

图 4 左归降糖解郁方逆转糖尿病合并抑郁症大鼠海马色氨酸-犬尿氨酸代谢通路 ( $\bar{x} \pm s$ )

Fig. 4 Effect of Zuogui Jiangtang Jieyu Formula on tryptophan-kynurenine metabolic pathway in hippocampus of diabetes with depression rats ( $\bar{x} \pm s$ )

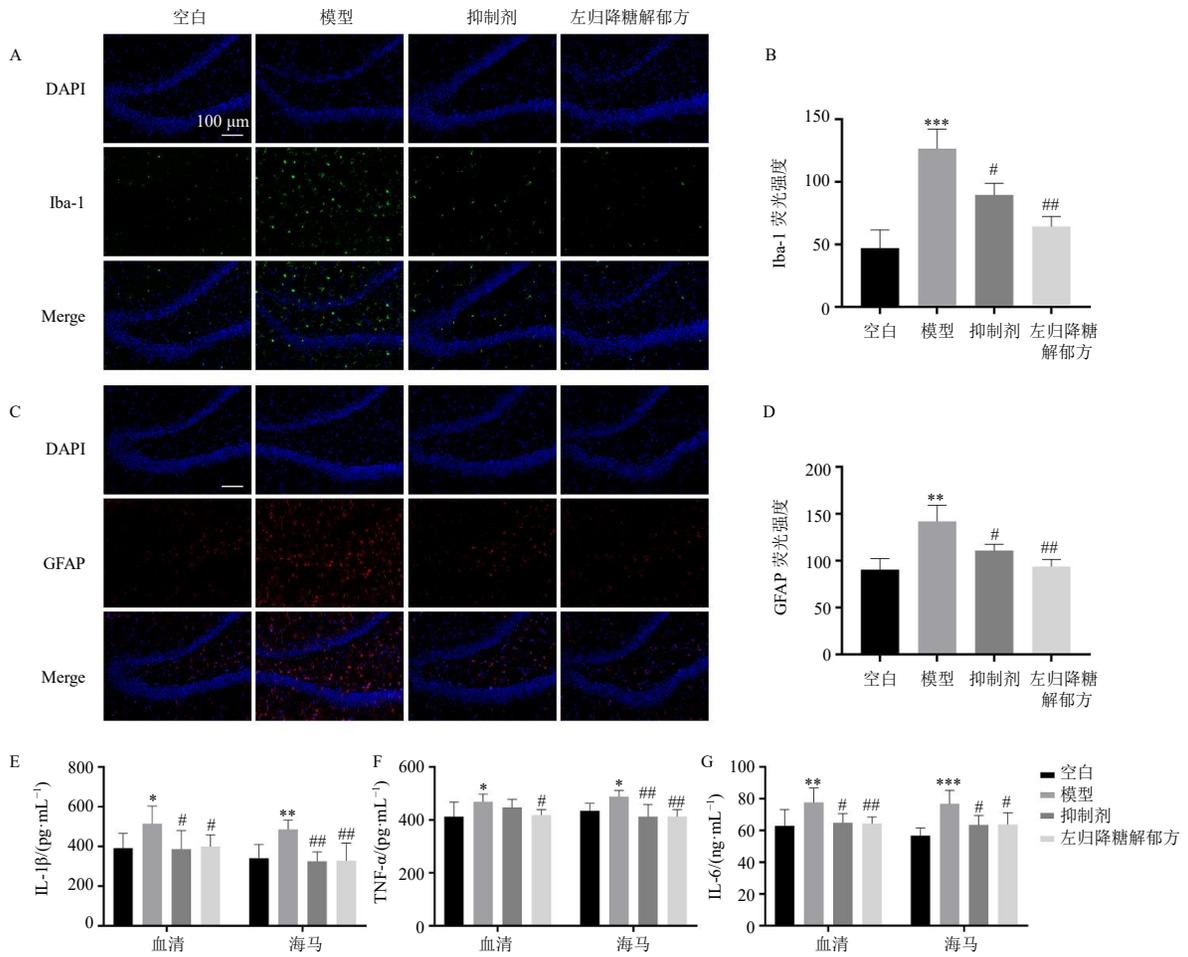
### 3.5 左归降糖解郁方抑制糖尿病合并抑郁症大鼠海马小胶质细胞和星形胶质细胞过度激活

如图 5-A~D 所示,与空白组比较,模型组海马中小胶质细胞标志物 Iba-1 及星形胶质细胞标志物 GFAP 表达显著上升 ( $P<0.01$ 、 $0.001$ ),呈现明显激活状态;与模型组比较,左归降糖解郁方组及 IDO 抑制剂组均能显著下调海马 Iba-1 和 GFAP 表达 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ )。

小胶质细胞作为神经系统的固有巨噬细胞,其受到激活时会分泌致炎因子。本研究也检测了血清和海马中炎症因子 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平。如图 5-E~G 所示,与空白组比较,模型组血清和海马中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平均显著升高 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ),机体处于高炎症水平;与模型组比较,左归降糖解郁方组和 IDO 抑制剂组均能有效改善血清和海马中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ )。因此,左归降糖解郁方对星形胶质细胞、小胶质细胞过度激活有抑制作用,并能降低机体炎症水平。

### 3.6 左归降糖解郁方抑制糖尿病合并抑郁症大鼠海马 NR 过度激活

喹啉酸是 NR 的激动剂,可产生兴奋性神经毒性,具有明确的神经毒性作用,与抑郁症的发作有关<sup>[5]</sup>。同时,星形胶质细胞和小胶质细胞上腺苷受体表达也与 NR 激活密切相关<sup>[17]</sup>。故本研究进一步探索了左归降糖解郁方对 NR 通路的影响。如图 6 所示,与空白组比较,模型组大鼠海马中 A1R、A3R 蛋白水平均显著下降 ( $P<0.01$ ),A2AR、NR2A 和 NR2B 蛋白表达水平均显著上升 ( $P<0.05$ 、 $0.001$ ),呈现 NR 通路过度激活;与模型组比较,左归降糖解郁方组 A1R、A3R 水平显著上调 ( $P<0.05$ ),并抑制 A2AR、NR2A、NR2B 蛋白表达水平 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ )。同时,IDO 抑制剂组也显著增加了 A1R、A3R 表达 ( $P<0.05$ ),并抑制 NR2A 蛋白水平 ( $P<0.05$ ),但对 A2AR、NR2B 无显著影响。因此,左归降糖解郁方对糖尿病合并抑郁症大鼠海马 NR 过度激活具有抑制作用。



A-免疫荧光检测海马 Iba-1 水平 (×200) B-定量 Iba-1 平均荧光强度 (n=3) C-免疫荧光检测海马 GFAP 水平 (×200) D-定量 GFAP 平均荧光强度 (n=3) E~G-ELISA 检测血清及海马中 IL-1β、TNF-α、IL-6 水平 (血清 n=8, 海马 n=5)

A-Iba-1 level in hippocampus by immunofluorescence (×200) B-quantitative mean fluorescence intensity of Iba-1 (n=3) C-GFAP level in hippocampus by immunofluorescence (×200) D-quantitative mean fluorescence intensity of GFAP (n=3) E~G-levels of IL-1β, TNF-α, IL-6 in serum and hippocampus by ELISA (serum n=8, hippocampus n=5)

图5 左归降糖解郁方对糖尿病合并抑郁症大鼠海马 Iba-1 和 GFAP 表达的影响 (x̄ ± s)

Fig. 5 Effect of Zuogui Jiangtang Jieyu Formula on Iba-1 and GFAP expressions in hippocampus of diabetes with depression rats (x̄ ± s)

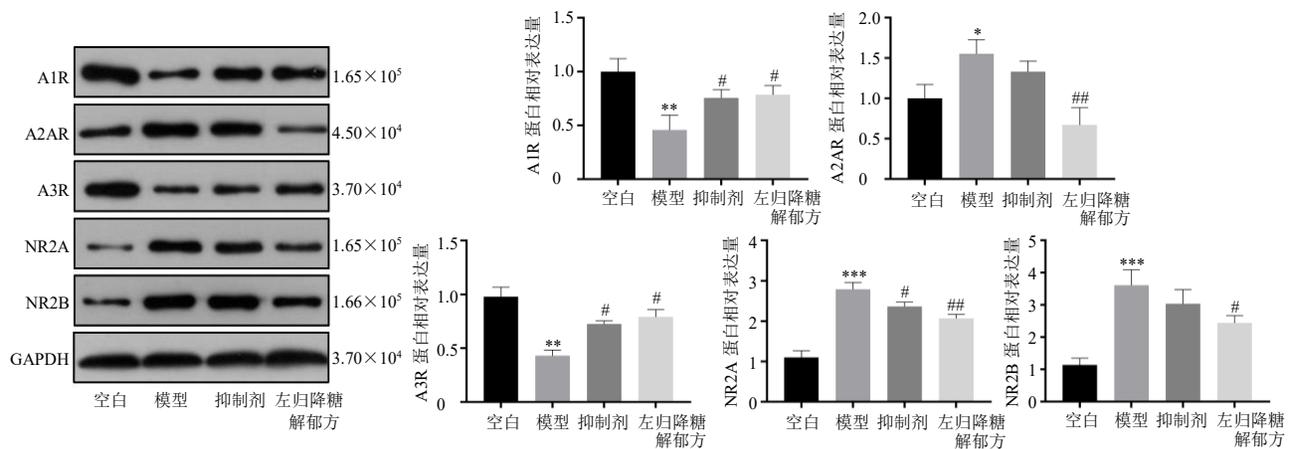


图6 左归降糖解郁方对糖尿病合并抑郁症大鼠海马 NR 通路相关蛋白表达的影响 (x̄ ± s, n=3)

Fig. 6 Effect of Zuogui Jiangtang Jieyu Formula on NR pathway related protein expressions in hippocampus of diabetes with depression rats (x̄ ± s, n=3)

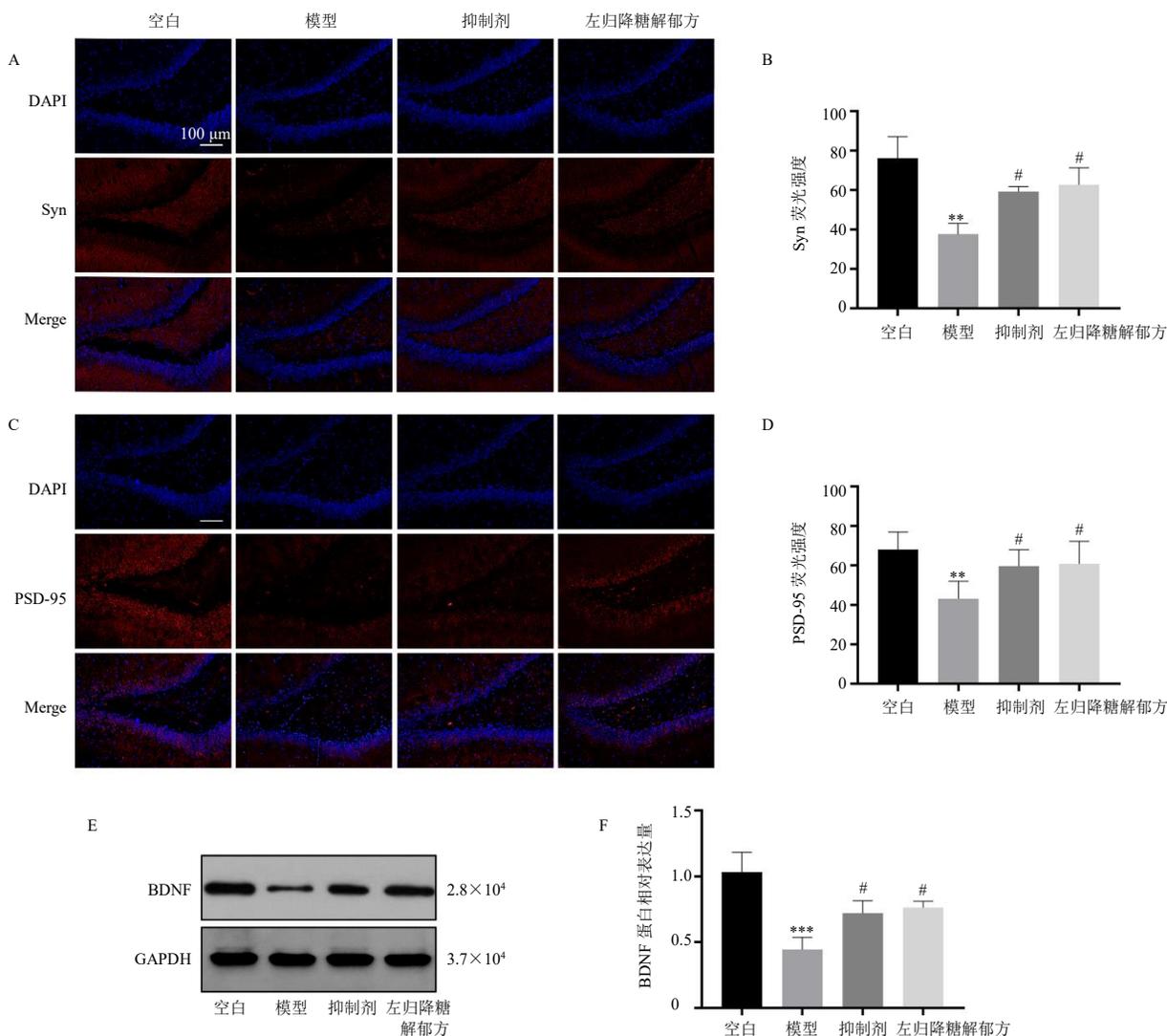
### 3.7 左归降糖解郁方逆转糖尿病合并抑郁症大鼠海马突触结构损伤

课题组前期发现, NR 过激与突触可塑性密切相关<sup>[18]</sup>。进一步对突触结构蛋白进行检测以评价海马突触结构损伤情况, 如图 7-A~D 所示, 与空白组比较, 模型组大鼠海马突触前膜标志蛋白 Syn 和突触后膜 PSD-95 表达均显著下降 ( $P < 0.01$ ), 提示突触结构损伤; 与模型组比较, 左归降糖解郁方组及 IDO 抑制剂组海马 Syn 和 PSD-95 表达均显著上调 ( $P < 0.05$ )。另外, 星形胶质细胞在神经系统中起营养作用, 其主要分泌 BDNF 对突触结构保护具

有重要作用。如图 7-E、F 所示, 与空白组比较, 模型组海马中 BDNF 蛋白表达水平显著下降 ( $P < 0.001$ ); 与模型组比较, 左归降糖解郁方组和 IDO 抑制剂组 BDNF 蛋白表达均显著上调 ( $P < 0.05$ )。因此, 左归降糖解郁方对糖尿病合并抑郁症大鼠海马突触结构具有保护作用。

### 3.8 左归降糖解郁方减轻糖尿病合并抑郁症大鼠海马病理损伤

如图 8-A 所示, HE、Nissl 染色显示, 空白组大鼠海马神经元排列整齐, 形态规则, 神经元间隙均匀, 尼氏小体清晰; 模型组海马神经元排列紊乱,

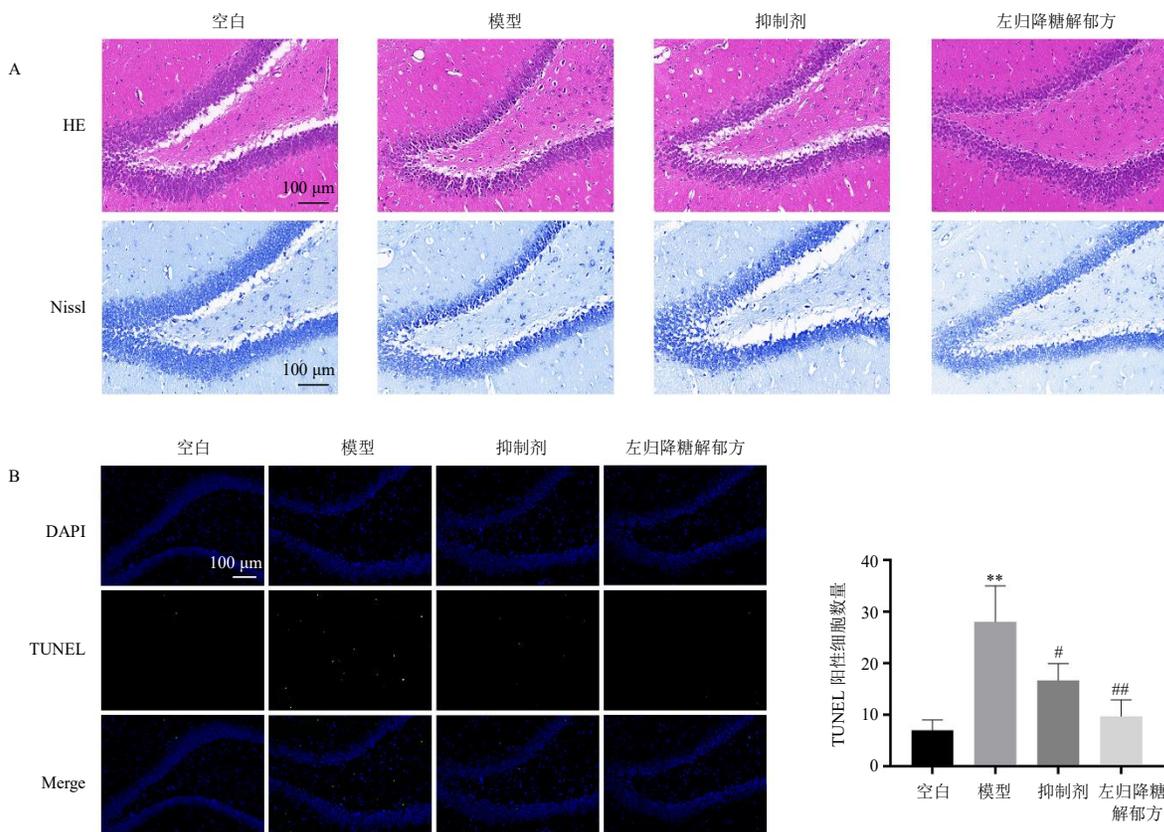


A-免疫荧光法检测海马 Syn 水平 ( $\times 200$ ) B-定量 Syn 平均荧光强度 C-免疫荧光法检测海马 PSD-95 水平 ( $\times 200$ ) D-定量 PSD-95 平均荧光强度 E、F-Western blotting 检测海马 BDNF 蛋白表达

A-Syn level in hippocampus by immunofluorescence ( $\times 200$ ) B-quantitation mean fluorescence intensity of Syn C-PSD-95 level in hippocampus by immunofluorescence ( $\times 200$ ) D-quantitation mean fluorescence intensity of PSD-95 E, F-BDNF protein expression in hippocampus by Western blotting

图 7 左归降糖解郁方对糖尿病合并抑郁症大鼠海马突触结构的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 7 Effect of Zuogui Jiangtang Jieyu Formula on hippocampal synaptic structure in diabetes with depression rats ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )



A-HE、Nissl 染色检测海马组织病理损伤 (×200) B-TUNEL 法检测海马神经元凋亡 (×200)  
 A-pathological lesion of hippocampus tissue by HE and Nissl staining (× 200) B-hippocampal neuron apoptosis by TUNEL (× 200)

图 8 左归降糖解郁方对糖尿病合并抑郁症大鼠海马病理组织及神经元凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 8 Effect of Zuogui Jiangtang Jieyu Formula on hippocampal pathological tissue and neuronal apoptosis in diabetes with depression rats ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

核固缩，胞质浓缩深染，细胞间隙增加，神经元数目和尼氏小体减少；左归降糖解郁方组和 IDO 抑制剂组神经元排列基本正常，密度增加，整体损伤情况明显缓解。如图 8-B 所示，与空白组比较，模型组海马 TUNEL 阳性细胞数量显著增加 ( $P < 0.01$ )，神经元凋亡增加；与模型组比较，左归降糖解郁方组和 IDO 抑制剂组 TUNEL 阳性细胞数量显著减少 ( $P < 0.05, 0.01$ )。表明左归降糖解郁方对糖尿病合并抑郁症大鼠海马具有神经元保护作用。

#### 4 讨论

海马是调节机体情绪及学习记忆功能的重要脑区。研究发现，在抑郁症和糖尿病的结构磁共振成像研究中海马体体积明显萎缩<sup>[19]</sup>。在糖尿病患者中，发现海马和前额叶皮层损伤最为严重。在长期高血糖状态及慢性氧化应激诱导下，海马易产生胰岛素抵抗，降低海马突触可塑性并影响海马结构完整性，导致认知障碍<sup>[20]</sup>。此外，也有研究认为长期

高血糖是一种应激状态，易过度激活下丘脑-垂体-肾上腺轴 (hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA)，而海马对 HPA 轴主要起负反馈调节作用，过多的糖皮质激素造成海马细胞损伤和凋亡，最终诱发抑郁<sup>[19]</sup>。本研究中也发现糖尿病合并抑郁症模型大鼠，在 Morris 水迷宫中呈现出明显的记忆和认知功能下降，并且海马区域具有明显病理损伤和凋亡细胞显著增加。

左归降糖解郁方由熟地、山茱萸、枸杞、菟丝子、贯叶连翘、丹参、丹皮、姜黄、牛膝、杜仲、黄芪组成，是课题组根据糖尿病合并抑郁症“虚、瘀、郁”的中医病机特点组方，以疏肝解郁、活血化瘀为治法，在经典名方左归丸的基础上加减而得。方中熟地滋补肾阴为君；臣以山茱萸、枸杞、菟丝子辅助君药加强滋阴补肾的作用，黄芪健脾益气，贯叶连翘疏肝解郁，丹参、丹皮活血祛瘀；佐以牛膝、杜仲补益肝肾，姜黄化瘀行气。全方共奏滋阴

益气、化痰解郁的功效<sup>[13,21]</sup>。本研究药效学结果发现,左归降糖解郁方能够显著降低模型大鼠空腹血糖,并明显改善抑郁样行为。

色氨酸是一种必需氨基酸,体内仅有 1%~5% 色氨酸经色氨酸羟化酶的作用下生成 5-HT,其余则主要在 IDO 或色氨酸-2,3-双加氧酶(tryptophan-2,3-dioxygenase, TDO)催化作用下生成犬尿氨酸,并继续代谢为多种活性物质,其中 IDO 是色氨酸代谢中的关键限速酶。在基础条件下,IDO 表达相对较低,但在遇到促炎细胞因子时,尤其是 IFN- $\gamma$  可强烈促进 IDO 表达并启动色氨酸-犬尿氨酸代谢通路,导致中枢和外周 5-HT 水平下降。5-HT 缺乏假说是抑郁症发生的经典假说。研究发现,糖尿病患者体内由于存在长期的慢性炎症,IDO 活性被异常激活,本研究结果与此一致,在糖尿病合并抑郁大鼠模型海马中,血清和海马中致炎因子 IFN- $\gamma$ 、CCL2、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平显著升高,并促进了 IDO 蛋白和 mRNA 表达,导致色氨酸代谢通路更倾向于色氨酸-犬尿氨酸代谢通路,使得犬尿氨酸水平显著升高。给予左归降糖解郁方后能显著下调海马炎症水平和 IDO 表达,与 IDO 抑制剂作用效果一致。

随着犬尿氨酸代谢通路被激活,犬尿氨酸的下游代谢可分为 2 个分支,KA-神经保护分支和喹啉酸-兴奋毒性分支。在 KA 分支中犬尿氨酸可被犬尿氨酸氨基转移酶(kynurenine aminotransferase, KAT)降解为 KA, KAT 主要存在于星形胶质细胞中,KA 可竞争性拮抗 NR,具有神经保护作用。在喹啉酸分支中,犬尿氨酸可被犬尿氨酸-3-单加氧酶(kynurenine 3-monooxygenase, KMO)作用下代谢为 3-羟基犬尿氨酸,并进一步代谢为喹啉酸, KMO 主要存在于小胶质细胞中,喹啉酸是 NR 激动剂,可促进 Ca<sup>2+</sup>内流<sup>[22]</sup>。研究证实,喹啉酸/犬尿氨酸认知能力下降的可靠生物标志物<sup>[23]</sup>。本研究检查了犬尿氨酸代谢倾向,发现在糖尿病合并抑郁症模型大鼠中,犬尿氨酸代谢更倾向于喹啉酸分支,并且导致了 NR 的过度激活。相反,IDO 抑制剂和左归降糖解郁方均能很好逆转犬尿氨酸代谢倾向,促进向 KA 分支代谢,同时也显著抑制了 NR 过度激活。另外也检测了海马中星形胶质细胞和小胶质细胞活化情况,发现模型组星形胶质细胞和小胶质细胞均存在明显激活,可能与促进喹啉酸代谢有关。而左归降糖解郁方和 IDO 抑制剂能显著抑制星形胶质细胞和小胶质细胞的过度活化。

NR 是谷氨酸离子型受体,在突触可塑性、记忆和认知中起重要作用。NR2A 与突触活性相关,而 NR2B 主要与促进死亡通路有关<sup>[24]</sup>。研究发现, NR2A、NR2B 表达的增加可促进 Ca<sup>2+</sup>内流,引起胞内 Ca<sup>2+</sup>超载,导致神经元损伤,促使认知能力的下降<sup>[25]</sup>。另外有研究发现, NR 过度激活可引起神经元突触损伤和神经元凋亡<sup>[10]</sup>。而 PSD-95、SYN、BDNF 可反映脑组织内突触损伤情况。PSD-95 是突触后膜中重要的支架蛋白,作为 NMDAR 与下游信号分子之间的桥梁,在神经元的成熟和突触的发育中发挥作用。此外, PSD-95 结合各种调节蛋白,包括类固醇受体辅助激活子(steroid receptor coactivator, SRC)、富含脯氨酸的酪氨酸激酶 2(proline-rich tyrosine kinase 2, Pyk2)、突触 Ras GTP 酶活化蛋白(synaptic Ras GTPase-activating protein, SynGAP)和神经元型一氧化氮合酶(neuronal nitric oxide synthase, nNOS),并可能将信号蛋白募集到 NR 上<sup>[26]</sup>。Syn 位于轴突末端突触囊泡膜上,是突触前终末端的特异性标志物,能够间接反映突触密度、分布。当糖尿病或抑郁症时,由于长期的炎症或 NR 过度激活时,可导致突触损伤,记忆认知障碍,此时脑内的 PSD-95、Syn 显著下降。本研究通过免疫荧光法定量观察到糖尿病合并抑郁模型大鼠海马组织内的 PSD-95、Syn 显著降低,同时海马内 BDNF 蛋白表达显著下调。经左归降糖解郁方或抑制剂干预后, PSD-95、Syn、BDNF 的表达均有不同程度上调,而且海马内细胞凋亡数量显著下降。

综上,本研究证实左归降糖解郁方具有良好的降血糖和抗抑郁作用,其可通过下调 IDO 表达水平改善色氨酸-犬尿氨酸代谢通路,从而减少喹啉酸的产生,并减轻对 NR 过度激活,对海马神经元和突触具有保护作用。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Liu J A, Liu L, Han Y S, *et al.* The molecular mechanism underlying mitophagy-mediated hippocampal neuron apoptosis in diabetes-related depression [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(15): 7342-7353.
- [2] Cole J B, Florez J C. Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2020, 16(7): 377-390.
- [3] Liu X B, Li Y X, Guan L, *et al.* A systematic review and meta-analysis of the prevalence and risk factors of depression in type 2 diabetes patients in China [J]. *Front*

- Med, 2022, 9: 759499.
- [4] Koziel K, Urbanska E M. Kynurenine pathway in diabetes mellitus—Novel pharmacological target? [J]. *Cells*, 2023, 12(3): 460.
- [5] Chen H S, Huang X, Zeng C, et al. The role of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 in early-onset post-stroke depression [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1125634.
- [6] Lanser L, Kink P, Egger E M, et al. Inflammation-induced tryptophan breakdown is related with anemia, fatigue, and depression in cancer [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 249.
- [7] 傅晶蕾, 褚晨吟, 周国忠, 等. 2型糖尿病患者血清磷脂DHA与炎症因子相关性研究 [J]. 中国现代医生, 2022, 60(15): 122-125.
- [8] 唐悦恒, 董慧. 犬尿氨酸途径与2型糖尿病的相关性研究进展 [J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(10): 1909-1914.
- [9] 徐畅, 张利东. 犬尿氨酸代谢通路在抑郁症中的研究进展 [J]. 东南国防医药, 2022, 24(1): 69-72.
- [10] 韩宜晓, 侯雅竹, 闫海峰, 等. N-甲基-D-天冬氨酸受体信号通路及其介导的细胞凋亡机制研究进展 [J]. 中国医学科学院学报, 2022, 44(1): 149-157.
- [11] Ling J, Liu J, Jin S, et al. Protective effects of Zuogui Jiangtang Jieyu Formula on hippocampal neurons in rats of diabetes complicated with depression via the TRP/KYN metabolic pathway [J]. *Digit Chin Med*, 2022, 5(2): 210-221.
- [12] 张驰, 周思倩, 李金来, 等. 基于UPLC-Q-TOF-MS的左归降糖解郁方体外成分分析 [J]. 中药新药与临床药理, 2023, 34(2): 228-240.
- [13] 杨蕙, 刘检, 唐林, 等. 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 [J]. 中草药, 2020, 51(11): 3013-3020.
- [14] 杨蕙, 朱青, 李薇, 等. 左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠前额叶皮层IR/IRS-1信号通路和能量代谢的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2022, 29(2): 74-78.
- [15] 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 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白表达的影响 [J]. 中草药, 2015, 46(21): 3214-3218.
- [16] Carabelli B, Delattre A M, Waltrick A P F, et al. Fish-oil supplementation decreases indoleamine-2,3-dioxygenase expression and increases hippocampal serotonin levels in the LPS depression model [J]. *Behav Brain Res*, 2020, 390: 112675.
- [17] 陈佳俊, 秦雪梅, 杜冠华, 等. 基于嘌呤能系统及嘌呤代谢的抑郁症发病机制研究进展 [J]. 药学学报, 2021, 56(9): 2464-2471.
- [18] 向韵, 吴梦瑶, 赵洪庆, 等. 左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症胎鼠海马神经元NR及mEPSC的影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2020, 40(3): 274-279.
- [19] 李仁实, 华梦羽, 庄向华, 等. 糖尿病合并抑郁发病机制的研究进展 [J]. 医学信息, 2022, 35(23): 166-170.
- [20] 孙倩, 梁宸, 高翔, 等. 2型糖尿病海马胰岛素抵抗与认知功能障碍的研究进展 [J]. 神经解剖学杂志, 2017, 33(3): 367-370.
- [21] 杨蕙, 雷诗卉, 李薇, 等. 左归降糖解郁方调控经典Wnt信号改善糖尿病并发抑郁症海马神经干细胞增殖与分化研究 [J]. 中草药, 2023, 54(7): 2163-2171.
- [22] 秦宇, 张永鹤. 犬尿氨酸代谢通路对抑郁症的影响机制研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2020, 36(12): 1640-1644.
- [23] Adrien C, Gabrielle M, Benjamin M, et al. Increased serum QUIN/KYNA is a reliable biomarker of post-stroke cognitive decline [J]. *Mol Neurodegener*, 2021, 16(1): 7.
- [24] 李春艳, 赵洪庆, 杨蕙, 等. 谷氨酸兴奋毒性及其调节剂的研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2022, 38(5): 645-649.
- [25] 王晓鹏, 黄永杰, 王芳, 等. NMDAR、NR2A、NR2B与糖尿病认知功能障碍的关系 [J]. 南方医科大学学报, 2013, 33(12): 1848-1851.
- [26] Yan W H, Guo T L, Liu N, et al. Erythropoietin ameliorates cognitive deficits by improving hippocampal and synaptic damage in streptozotocin-induced diabetic mice [J]. *Cell Signal*, 2023, 106: 110614.

[责任编辑 李亚楠]