

左归降糖解郁方调控 SIRT1/c-Myc/LDHA 信号通路影响糖尿病并发抑郁症海马乳酸代谢的机制研究

杨 蕙¹, 孟 盼², 张秀丽², 韩远山¹, 雷诗卉¹, 李 薇¹, 刘 检¹, 王宇红^{2*}

1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007

2. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208

摘要: 目的 研究左归降糖解郁方调控糖尿病并发抑郁症海马乳酸代谢的作用及机制。方法 SD大鼠随机分为对照组、模型组、阳性对照(二甲双胍0.18 mg/kg+氟西汀1.8 mg/kg)组和左归降糖解郁方高、中、低剂量(20.52、10.26、5.13 g/kg)组, 每组8只。除对照组外, 其余大鼠采用高脂饲料饲养、尾iv链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)、慢性温和不可预知应激法进行糖尿病并发抑郁症疾病构建糖尿病并发抑郁症大鼠模型。给予药物干预28 d, 采用强迫游泳实验和水迷宫实验评价大鼠的抑郁行为; 采用血糖试纸测定空腹血糖, 采用试剂盒检测大鼠空腹胰岛素和海马丙酮酸、乳酸、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide⁺, NAD⁺)含量, 并计算胰岛素敏感性和胰岛素抵抗指数; 采用液相色谱-质谱联用仪(liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)以及多元统计分析方法对海马进行代谢组学分析并筛选差异代谢物; 采用Western blotting检测沉默调节蛋白1(sirtuin 1, SIRT1)/Myc原癌基因(cancer-Myc, c-Myc)/乳酸脱氢酶A(lactate dehydrogenase A, LDHA)信号通路蛋白表达。给予SIRT1抑制剂干预后, 考察左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠的影响。结果 左归降糖解郁方高剂量组可显著降低糖尿病并发抑郁症大鼠的空腹血糖和胰岛素含量($P<0.05$ 、 0.01), 升高胰岛素敏感指数($P<0.01$), 降低胰岛素抵抗指数($P<0.01$), 缩短大鼠在强迫游泳实验中的不动时间和水迷宫实验中的登台时间($P<0.05$ 、 0.01), 增加在目标象限的路程比($P<0.01$)。代谢组学研究发现, 乳酸对于区分模型组和左归降糖解郁方高剂量组代谢差异的贡献值最大。Western blotting结果显示, 左归降糖解郁方高剂量组可显著增加模型大鼠海马SIRT1、c-Myc、LDHA蛋白表达($P<0.01$)。给予SIRT1抑制剂干预后, 左归降糖解郁方对模型大鼠血糖、胰岛素抵抗以及抑郁样行为的改善作用被抑制($P<0.05$ 、 0.01)。对乳酸相关代谢物的研究发现, SIRT1抑制剂可抑制左归降糖解郁方对SIRT1/c-Myc/LDHA信号通路的激活作用($P<0.01$), 从而抑制乳酸的生成, 减少海马乳酸含量($P<0.05$)。结论 左归降糖解郁方通过调控海马SIRT1/c-Myc/LDHA信号通路, 催化丙酮酸转化为乳酸, 从而改善糖尿病并发抑郁症大鼠海马乳酸代谢。

关键词: 左归降糖解郁方; 糖尿病并发抑郁症; 乳酸; 沉默调节蛋白1; 代谢组学; 地黄苷 D; 莫诺苷; 马钱苷

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2024)22-7724-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.22.016

Mechanism of Zuogui Jiangtang Jieyu Formula on treatment of hippocampal lactate metabolism in diabetes-related depression based on SIRT1/c-Myc/LDHA signaling pathway

YANG Hui¹, MENG Pan², ZHANG Xiuli², HAN Yuanshan¹, LEI Shihui¹, LI Wei¹, LIU Jian¹, WANG Yuhong²

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

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: Objective To study the effect and mechanism of Zuogui Jiangtang Jieyu Formula (左归降糖解郁方) on regulating lactate metabolism in hippocampus of diabetes-related depression. **Methods** SD rats were randomly divided into control group, model group, positive control group (metformin 0.18 mg/kg + fluoxetine 1.8 mg/kg), and Zuogui Jiangtang Jieyu Formula high-, medium-,

收稿日期: 2024-07-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82474476, 82104793); 湖南省自然科学基金优秀青年项目(2024JJ4033); 湖南省自然科学基金资助项目(2022JJ30451, 2023JJ30476); 湖南省卫生健康委项目(W20243210)

作者简介: 杨 蕙(1987—), 女, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向为中医药治疗糖尿病及其并发症。

Tel: (0731)85369072 E-mail: 348541369@qq.com

***通信作者:** 王宇红(1965—), 女, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药新药研究。Tel: (0731)88459551 E-mail: wyh107@126.com

and low-dose (20.52, 10.26, 5.13 g/kg) groups, with eight rats in each group. In addition to control group, other rats were fed with high-fat diet, tail iv streptozotocin (STZ) and receipt chronic mild unpredictable stress to establish diabetes-related depression model. Drug intervention was administered for 28 d, and the depression like behavior of rats was evaluated using forced swimming and water maze experiments; Fasting blood glucose was measured using blood glucose test strips, fasting insulin and levels of hippocampal pyruvate, lactate, and nicotinamide adenine dinucleotide⁺ (NAD⁺) in rats were detected using a reagent kit, insulin sensitivity and insulin resistance index were calculated; Metabolomics analysis and screening of differential metabolites in hippocampus were performed using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and multivariate statistical analysis methods; Western blotting was used to detect the expressions of sirtuin 1 (SIRT1)/cancer-Myc (c-Myc)/lactate dehydrogenase A (LDHA) signaling pathway proteins. After the intervention of SIRT1 inhibitor, the effect of Zuogui Jiangtang Jieyu Formula on diabetes-related depression were investigated. **Results** Zuogui Jiangtang Jieyu Formula high-dose group significantly reduced the fasting blood glucose and insulin contents ($P < 0.05$, 0.01), increased insulin sensitivity index ($P < 0.01$), reduced insulin resistance index ($P < 0.01$), shorten the immobility time of rats in forced swimming experiments and the stage time in water maze experiments ($P < 0.05$, 0.01), and increased the distance ratio in the target quadrant ($P < 0.01$). Metabolomics studies found that the lactate had the greatest contribution in distinguishing metabolic differences between the model group and Zuogui Jiangtang Jieyu Formula high-dose group. Western blotting results showed that Zuogui Jiangtang Jieyu Formula high-dose group significantly increased the expressions of SIRT1, c-Myc and LDHA proteins in hippocampus of model rats ($P < 0.01$). After intervention with SIRT1 inhibitor, the improvement effect of Zuogui Jiangtang Jieyu Formula on blood glucose, insulin resistance and depression like behavior in model rats was inhibited ($P < 0.05$, 0.01). Research on lactate related metabolites found that SIRT1 inhibitor could inhibit the activation of SIRT1/c-Myc/LDHA signaling pathway by Zuogui Jiangtang Jieyu Formula ($P < 0.01$), thereby suppressing lactate production and reducing hippocampal lactate content ($P < 0.05$). **Conclusion** Zuogui Jiangtang Jieyu Formula can regulate the hippocampal SIRT1/c-Myc/LDHA signaling pathway, catalyze the conversion of pyruvate into lactic acid, and thus improve the metabolism of lactic acid in hippocampus of rats with diabetes-related depression.

Key words: Zuogui Jiangtang Jieyu Formula; diabetes-related depression; lactate; sirtuin 1; metabolomics; rhmannioside D; morroniside; loganin

2 型糖尿病是一种以慢性高血糖为特征的代谢性疾病, 抑郁症是其常见并发症。研究表明, 糖尿病患者并发抑郁症的发生率是正常人患病的 2~3 倍, 而其中仅 25%~50% 的患者接受了抑郁症治疗^[1]。糖尿病本身以及用药过程中产生的体质量变化、睡眠障碍、疲劳和性欲下降等多种问题均会对患者的心理健康产生影响, 增加并发抑郁症风险。中枢海马是调节情绪和认知功能的核心脑区, 海马神经细胞摄能、储能、用能的正常运转是其保持正常神经活动的基础, 极易受累于糖尿病引起的能量代谢紊乱^[2]。研究表明, 糖尿病不仅可引起中枢神经元葡萄糖氧化缺陷、星形胶质细胞糖原合成障碍, 还可造成乳酸代谢异常, 并通过干扰胞间乳酸穿梭影响神经细胞能量代谢^[3]。近年来, 在糖尿病认知障碍、阿尔茨海默症、精神分裂症等疾病中均发现了低量乳酸及其对神经功能的影响^[4], 但在糖尿病并发抑郁症中乳酸及其代谢机制是否存在变化, 尚未见研究。

糖尿病并发抑郁症属“消渴”与“郁证”范畴。《济生方》中提到“消渴之疾, 皆起于肾”, 而

肾为先天之本, 藏精生髓, 上通于脑, 故“肾精不足则志气衰”, 意志不足, 继而神明不用。课题组前期基于糖尿病并发抑郁症肾阴亏虚、中气虚衰基础病机, 提炼出气阴两虚、血瘀肝郁的病机特点, 并在明代医家张景岳治疗真阴亏损的代表方剂左归丸的基础上, 组方左归降糖解郁方, 其中, 君药熟地黄发挥滋养肾阴的作用; 臣药山茱萸和枸杞子加强滋补肾阴; 其余为佐药, 发挥健脾、益气、化瘀、解郁等作用, 全方治法为疏肝解郁、活血化瘀。前期对其开展实验研究发现, 该方可通过调节海马胰岛素信号, 提高神经细胞对葡萄糖的摄取和储存功能, 改善糖尿病并发抑郁症大鼠海马神经元的糖代谢^[5]。同时, 左归降糖解郁方还可增加大鼠海马中乳酸转运体单羧酸转运蛋白 4 的表达, 改善乳酸的胞间转运^[6]。中枢乳酸不仅是兴奋性神经元优先利用的能量底物, 而且在神经元信息传递和突触功能中发挥重要作用^[7], 故本研究结合代谢组学和实验验证, 探究左归降糖解郁方对海马中乳酸代谢的影响, 以期丰富左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠中枢能量代谢的调控作用。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 80 只, 体质量 180~200 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 许可证号 SCXK(湘) 2019-0004。动物饲养于湖南中医药大学第一附属医院医学创新实验中心动物房, 相对湿度 40%~70%、温度 20~26 °C 的环境下, 饲养期间自由进食饮水, 适应性饲养 5 d 后开始实验。动物实验经湖南中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会批准(批准号 ZYFY20231110-112)。

1.2 药材

左归降糖解郁方由熟地黄 15 g、山茱萸 12 g、枸杞 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, 上述药材饮片均购自湖南中医药大学第一附属医院中药房, 并经湖南中医药大学第一附属医院药学部张志国教授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。

将上述各药材饮片按比例混合后, 加入 10 倍量水, 武火煮沸后文火 1.5 h, 滤过; 滤渣加入 8 倍量水, 武火煮沸后文火 1 h, 滤过, 合并 2 次滤液, 备用。课题组前期采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱技术对左归降糖解郁方进行了定性分析, 共鉴定出 57 种化合物。左归降糖解郁方中地黄苷 D 质量浓度为 0.11 mg/mL, 莫诺苷和马钱苷质量浓度为 1.8 mg/mL。

1.3 药品与试剂

高脂饲料购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 由 0.5% 胆固醇、10.0% 蛋黄粉、10.0% 猪油、20.0% 蔗糖、59.5% 基础饲料组成, 生产许可证号 SCXK

(湘) 2020-0006; 链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ, 批号 S8050) 购自北京索莱宝科技有限公司; 沉默调节蛋白 1 (sirtuin 1, SIRT1) 抑制剂 Sirtinol (批号 HY-13515/CS-5291) 购自美国 MedChemExpress 公司; 胰岛素试剂盒 (批号 MM-0587R2)、丙酮酸试剂盒 (批号 MM-71218R2)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide⁺, NAD⁺) 试剂盒 (批号 MM-71308R2) 购自江苏酶免实业有限公司; 乳酸试剂盒 (批号 FY40175-B) 购自江苏菲亚生物科技有限公司; SIRT1 抗体 (批号 2028)、Myc 原癌基因 (cancer-Myc, c-Myc) 抗体 (批号 5605)、乳酸脱氢酶 A (lactate dehydrogenase A, LDHA) 抗体 (批号 2012)、 β -actin 抗体 (批号 4967)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (批号 7074) 购自美国 CST 公司。

1.4 仪器

GA-3 型血糖仪 (三诺生物传感股份有限公司); ZS-QPT 型强迫游泳缸、Morris 水迷宫缸 (北京众实迪创科技发展有限公司); Enspire 多功能酶标仪 (美国PekinElmer公司); Mini Trans-Blot 蛋白转印系统 (美国Bio-Rad公司); FluorChem R 型超灵敏多色荧光成像分析系统 (美国ProteinSimple公司); AB Triple TOF 6600 型质谱仪 (美国AB SCIEX公司); Agilent 1290 Infinity LC 超高压液相色谱仪 (美国Agilent公司); Waters Acquity UPLC BEH Amide 色谱柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m, 美国Waters公司)。

2 方法

2.1 糖尿病并发抑郁症大鼠模型的构建^[8]

采用高脂喂养、STZ 注射、慢性温和不可预知应激联合的方法建立糖尿病并发抑郁症大鼠模型, 动物自由饮水、喂食高脂饲料, 持续喂养 4 周, 随后尾 iv STZ (38 mg/kg)。注射前动物需禁食 8 h, STZ 需采用 4 °C 的柠檬酸缓冲液 (pH 4.9) 进行溶解并保存于棕色玻璃瓶中, 避光低温保存; 注射后, 动物需继续禁食 3 h。尾 iv STZ 3 d 后, 动物禁食 7 h, 采尾尖血测定空腹血糖, 血糖值 ≥ 16.0 mmol/L 为糖尿病模型大鼠^[9]。

血糖符合标准的糖尿病模型大鼠进行慢性温和不可预知应激造模。应激措施包括倾笼 45° 24 h、噪音 8 h、昼夜颠倒 24 h、潮湿垫料 12 h、0 °C 冰水浴 5 min、夹尾 2 min; 应激方式为每日选取 2 种刺激方法, 隔日不重复; 应激时间为 4 周。

2.2 分组及给药

2.2.1 左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症的改

善作用 40 只糖尿病并发抑郁症模型大鼠随机分为模型组、阳性对照（二甲双胍 0.18 mg/kg+氟西汀 1.8 mg/kg）组和左归降糖解郁方高、中、低剂量（20.52、10.26、5.13 g/kg，分别相当于临床等效剂量的 2.0、1.0、0.5 倍）组，每组 8 只，另取 8 只 SD 大鼠作为对照组。各给药组 ig 相应药物（10 mL/kg），对照组和模型组 ig 等体积的蒸馏水，1 次/d，连续给药 28 d。

2.2.2 SIRT1 抑制剂对左归降糖解郁方改善糖尿病并发抑郁症的影响 18 只糖尿病并发抑郁症模型大鼠随机分为模型组、左归降糖解郁方（20.52 g/kg）组和左归降糖解郁方（20.52 g/kg）+Sirtinol（10 mg/kg）^[9] 组，每组 6 只，另取 6 只 SD 大鼠作为对照组。各给药组 ig 左归降糖解郁方（10 mL/kg），对照组和模型组 ig 等体积的蒸馏水，1 次/d，连续给药 28 d；自给药第 15 天，左归降糖解郁方+Sirtinol 组连续 14 d ip Sirtinol（3 mL/kg），其余各组 ip 等体积的二甲基亚砷（dimethyl sulfoxide, DMSO）。

2.3 行为学实验

2.3.1 强迫游泳实验 给药结束后，动物先进行强迫游泳实验，用以评价动物的抑郁样行为。实验前，采用体质量最高的大鼠标定水位，以其在水中后肢无法触底且不能从水面翻跳出缸为实验用水位，所有动物实验时均需保持水位一致。实验时，将动物放入游泳缸中并开始计时，适应 1 min 后，记录动物在 3 min 内在缸中的静止时间，动物静止标准为无明显划水动作，身体呈漂浮状态，前爪蜷缩胸前，后抓张开或有轻微摆动用以保持平衡。

2.3.2 水迷宫实验 强迫游泳实验结束次日，动物进行水迷宫实验。实验前，将圆形水箱等分为 4 个象限，将配套圆形平台放置于其中 1 个象限（记为第 1 象限）的中央。向水箱中注入清水，水位要求高于平台 2 cm。实验持续 6 d，前 4 d 将大鼠依次从不同象限水箱边缘轻放于水中，引导其识别水下平台的位置，顺序为第 3→4→1→2 象限。训练结束后，第 5 天将大鼠从第 3 象限进入水中，并开始计时，至其找到并登上水下平台，计时结束，所用时间反映动物对水下平台的位置的识别情况。第 6 天，拿走水下平台，仍将大鼠从第 3 象限入水，记录其在 1.5 min 内游泳的路程，并计算其在第 1 象限路程与总路程的比值，反映其对平台的记忆情况。

2.4 ELISA 检测空腹血糖、外周胰岛素以及海马中丙酮酸、乳酸、NAD⁺含量

大鼠行为学测试结束次日，禁食不禁水 7 h 后，采尾尖血用血糖试纸测定空腹血糖含量，随后动物麻醉取腹主动脉血，4 ℃、2 000 r/min 离心 15 min，收集上清液，按照试剂盒说明书测定胰岛素含量，并计算胰岛素敏感指数和胰岛素抵抗指数。

胰岛素敏感指数 = $\ln[1/(\text{空腹血糖含量} \times \text{胰岛素含量})]$

胰岛素抵抗指数 = $(\text{空腹血糖含量} \times \text{胰岛素含量})/22.5$

取大鼠海马组织，采用匀浆机将海马与 PBS 溶液按照 50 mg:1 mL 的比例制备成混悬液，3 000 r/min 离心 20 min 后取上清，按照试剂盒说明书测定丙酮酸、乳酸和 NAD⁺含量。

2.5 海马代谢组学分析

2.5.1 样本预处理 取“2.2.1”项下模型组和左归降糖解郁方高剂量组大鼠海马样本各 8 个，采用液相色谱-质谱联用仪（liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS）进行代谢组学分析，检测由广州基迪奥生物科技有限公司完成。海马样本分别加入甲醇-乙腈-水（2:2:1），混匀，低温超声 30 min，静置 10 min 后 14 000 r/min 低温离心 20 min，取上清真空干燥。加入 100 μL 乙腈水溶液（1:1）复溶，14 000 r/min 低温离心 15 min 后进行 LC-MS/MS 分析。

2.5.2 色谱条件 采用 Agilent 1290 Infinity LC 超高压液相色谱仪，Waters Acquity UPLC BEH Amide 色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.7 μm），流动相为水+25 mmol/L 乙酸铵+25 mmol/L 氨水（A）-乙腈（B），梯度洗脱：0~0.5 min，95%B；0.5~7.0 min，95%~65%B；7.0~8.0 min，65%~40%B；8.0~9.0 min，40%B；9.0~9.1 min，40%~95%B；9.1~12.0 min，95%B。体积流量 0.5 mL/min；柱温 25 ℃；进样体积 2 μL；整个分析过程中样品置于 4 ℃自动进样器中。

2.5.3 质谱条件 采用正、负离子模式进行检测。离子源电压为±5 500 V，离子源温度 600 ℃，飞行时间质谱扫描范围为 m/z 60~1 000，产物离子扫描范围为 m/z 25~1 000。二级质谱采用信息依赖采集获得，在高灵敏度模式下，去簇电位为±60 V，碰撞能量为（35±15）eV。

2.5.4 质控样品的处理 取“2.5.1”项下样本进行等量混合，每个样本 10 μL。在待测样本 LC-MS/MS

进样前, 运行 8 个质控样本; 进样过程中, 每组样本进样结束后插入 1 针质控样品。

2.5.5 代谢组学数据处理 数据经 Proteo Wizard 转换成 MzML 格式, 然后采用 XCMS 程序进行峰对齐、保留时间校正和提取峰面积计算。分别对正、负离子模式下的数据进行主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 等多元统计分析, 采用京都基因和基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)、代谢途径分析 (metabolic pathway analysis, MetPA)、代谢集富集分析 (metabolite set enrichment analysis, MSEA)、变量重要性投影分析 (variable importance in projection, VIP) 4 种方法分析差异代谢途径和差异代谢物。

2.6 Western blotting 检测海马 SIRT1、c-Myc、LDHA 蛋白表达

取海马组织 1 g, 加入 1 mL 裂解液, 低温环境下快速匀浆, 4 ℃ 静置 2 h, 13 000 r/min 低温离心 15 min, 收集上清液并采用核酸蛋白浓度测定仪测定蛋白浓度, 以浓度最低样本为基线, 稀释蛋白提取液至统一浓度。加入蛋白上样缓冲液, 于金属浴

锅 100 ℃ 加热 10 min 使蛋白变性。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 室温封闭 1 h, 分别加入 SIRT1 (1:1 000)、c-Myc (1:1 000)、LDHA (1:1 000)、 β -actin (1:2 000) 抗兔, 4 ℃ 孵育过夜; 次日, TBST 洗涤 3 次, 加入二抗 (1:5 000), 室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次后用 ECL 法浸膜, 在超灵敏多色荧光成像分析系统中显影和定量。

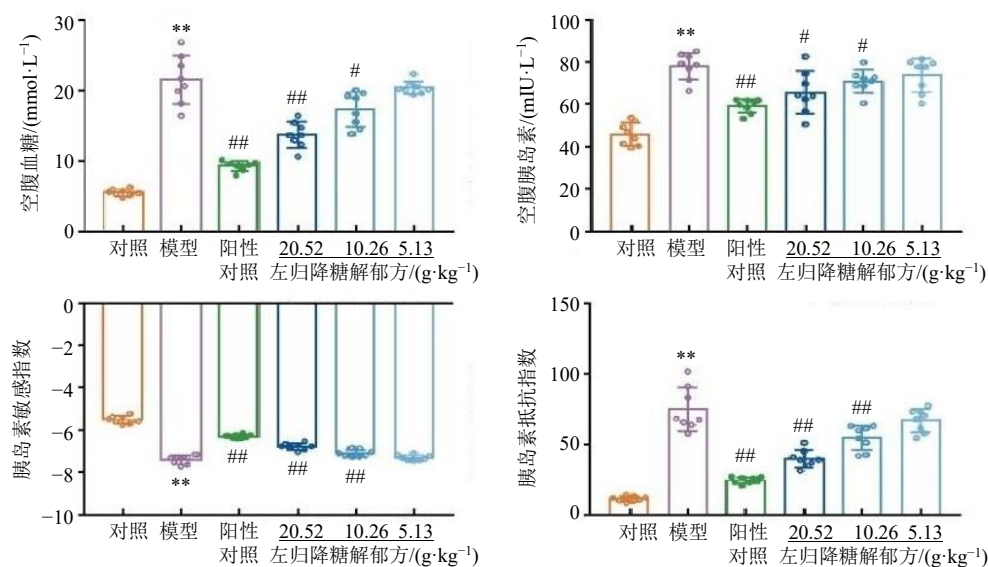
2.7 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 16.0 软件进行单因素方差分析。

3 结果

3.1 左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠空腹血糖及胰岛素敏感性的影响

如图 1 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠空腹血糖和空腹胰岛素含量显著升高 ($P < 0.01$), 胰岛素敏感指数显著降低 ($P < 0.01$), 胰岛素抵抗指数显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 阳性对照组和左归降糖解郁方高、中剂量组大鼠空腹血糖和空腹胰岛素含量显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 胰岛素敏感指数显著升高 ($P < 0.01$), 胰岛素抵抗指数显著降低 ($P < 0.01$), 左归降糖解郁方低剂量组无显著差异。



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

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

图 1 左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠空腹血糖及胰岛素敏感性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

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

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和认知功能的影响

如图 2 所示,与对照组比较,模型组大鼠在强迫游泳实验中的不动时间显著延长 ($P<0.01$),在水迷宫实验中的登台时间显著延长 ($P<0.01$),而在目标象限的路程比显著减少 ($P<0.01$);与模型组比较,阳性对照组和左归降糖解郁方高、中剂量组大鼠在强迫游泳实验中的不动时间显著缩短

($P<0.05$ 、 0.01),在水迷宫实验中的登台时间显著缩短 ($P<0.05$ 、 0.01),在目标象限的路程比显著增加 ($P<0.05$ 、 0.01)。

3.3 左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠海马代谢组学的影响

对模型组和左归降糖解郁方高剂量组大鼠海马代谢组学数据进行多元统计分析,如图 3 所示,PCA 结果可见在正、负离子模式下,2 组样本组内聚集

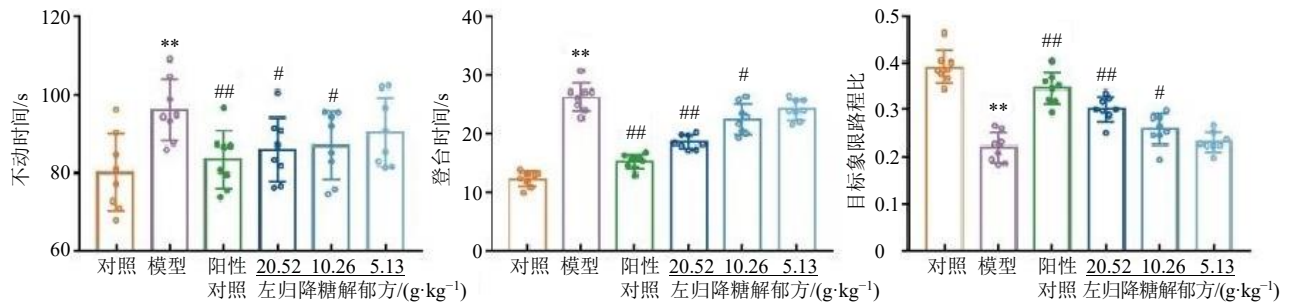
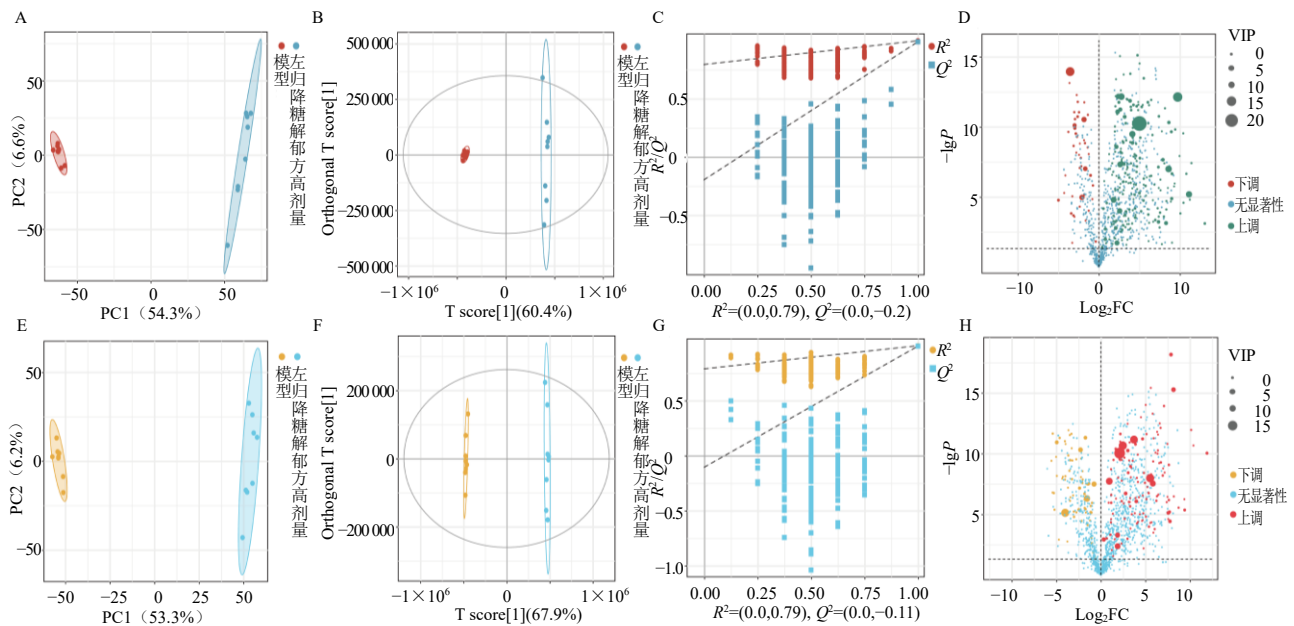


图 2 左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠抑郁样行为和认知功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 2 Effect of Zuogui Jiangtang Jieyu Formula on depressive-like behavior and cognitive function of rats with diabetes-related depression ($\bar{x} \pm s, n=8$)



A-负离子模式下 PCA 散点图; B-负离子模式下 OPLS-DA 得分图; C-负离子模式下 OPLS-DA 置换检验图; D-负离子模式下差异代谢物散点图; E-正离子模式下 PCA 散点图; F-正离子模式下 OPLS-DA 得分图; G-正离子模式下 OPLS-DA 置换检验图; H-正离子模式下差异代谢物散点图。

A-PCA scatter plot in negative ion mode; B-OPLS-DA score plot in negative ion mode; C-OPLS-DA displacement test chart in negative ion mode; D-scatter plot of differential metabolites in negative ion mode; E-PCA scatter plot in positive ion mode; F-OPLS-DA score plot in positive ion mode; G-OPLS-DA displacement test chart in positive ion mode; H-scatter plot of differential metabolites in positive ion mode.

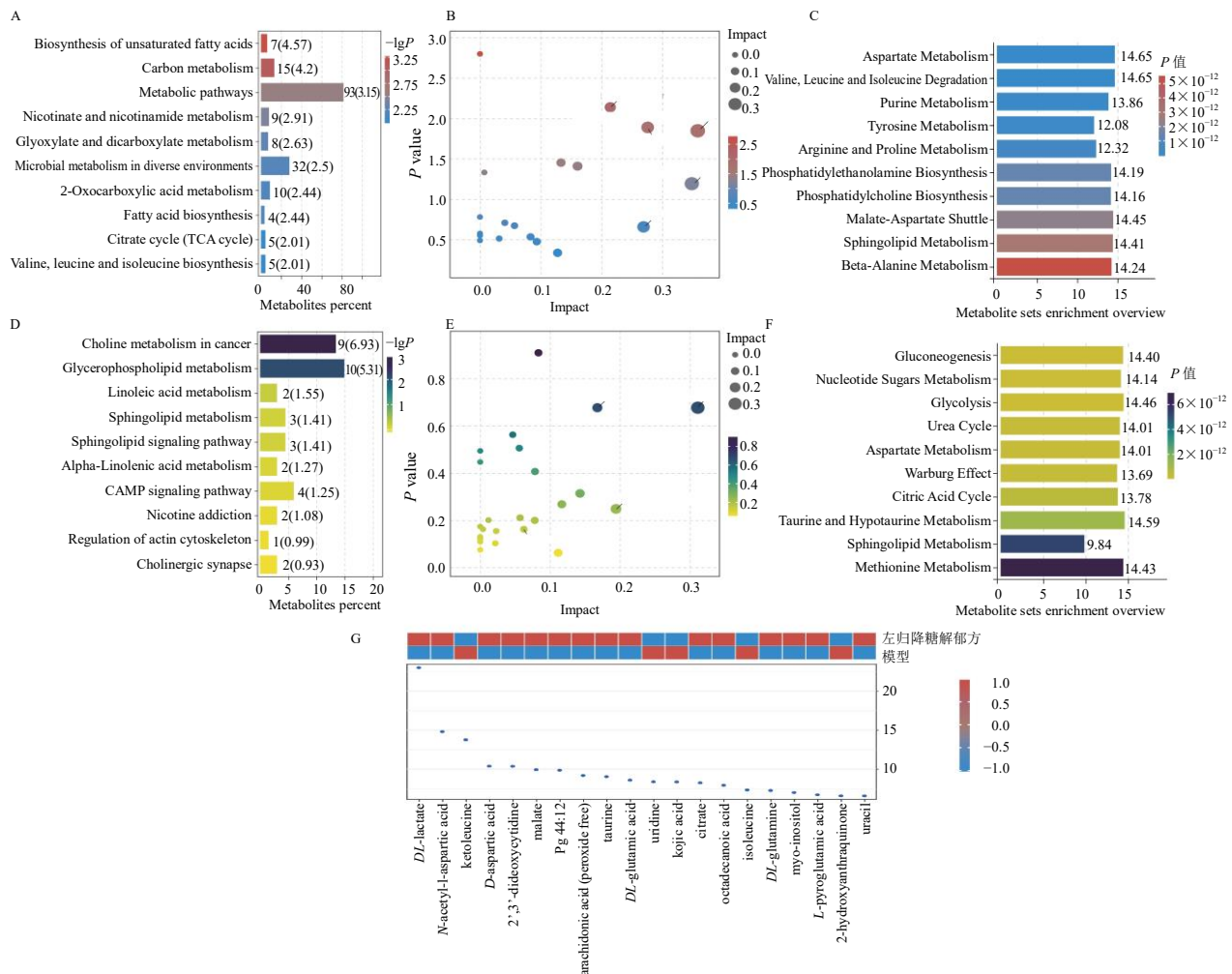
图 3 代谢组学数据多元统计分析 ($n=8$)

Fig. 3 Multivariate statistical analysis of metabolomics ($n=8$)

性良好, 组间距离较远, 提示组内样本重复性好, 组间样本差异度大。OPLS-DA 的置换检验图显示, 在正、负离子模式下, Q^2 回归曲线在纵坐标的交叉点均小于 0, 提示 2 种模式下的 OPLS-DA 模型预测结果均可靠, 不存在过拟合问题; 从 OPLS-DA 得分图可知, 2 组样本差异较大, 可用于进行差异分析。以 $VIP \geq 1$ 、 $P \leq 0.05$ 为筛选标准进行基本差异分析, 在负离子模式下, 共得到上调差异代谢物 223 个, 下调 46 个; 在正离子模式下, 共得到上调差异代谢物 128 个, 下调 73 个。

随后, 对 2 组差异代谢物的富集情况进行了 KEGG、MetPA、MSEA 分析。如图 4 所示, 在负离子模式下, 差异代谢物 KEGG 分析显示, 代谢途径

富集到的差异代谢物数目最多; MetPA 分析显示, 柠檬酸循环、丙酮酸代谢、磷酸戊糖途径、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢、乙醛酸和二羧酸代谢等代谢途径在代谢网络中较为重要; MSEA 分析未发现与糖代谢相关的代谢途径富集。在正离子模式下, KEGG 分析未富集到与糖代谢相关的代谢途径; MetPA 分析显示, 糖代谢途径在该模式下的代谢网络中占比较少, 仅发现磷酸戊糖途径; 但在 MSEA 分析中发现, 葡萄糖新生、糖酵解、Warburg 效应、柠檬酸循环等代谢途径富集程度较高。最后, 对负离子模式下的差异代谢物的贡献度进行 VIP 计算, 发现乳酸对于区分模型组和左归降糖解郁方高剂量组的贡献值最大。



A-负离子模式下 KEGG 分析; B-负离子模式下 MetPA 分析; C-负离子模式下 MSEA 分析; D-正离子模式下 KEGG 分析; E-正离子模式下 MetPA 分析; F-正离子模式下 MSEA 分析; G-负离子模式下代谢物 VIP 图。

A-KEGG analysis in negative ion mode; B-MetPA analysis in negative ion mode; C-MSEA analysis in negative ion mode; D-KEGG analysis in positive ion mode; E-MetPA analysis in positive ion mode; F-MSEA analysis in positive ion mode; G-metabolite VIP diagram in negative ion mode.

图 4 差异代谢物富集分析 ($n = 8$)

Fig. 4 Differential metabolite enrichment analysis ($n = 8$)

3.4 左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠海马 SIRT1、c-Myc、LDHA 蛋白表达的影响

如图 5 所示,与对照组比较,模型组大鼠海马中 SIRT1、c-Myc、LDHA 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$);与模型组比较,左归降糖解郁方高

剂量组海马 SIRT1、c-Myc、LDHA 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.01$),左归降糖解郁方中剂量组海马 SIRT1、c-Myc 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.01$),左归降糖解郁方低剂量组 SIRT1、c-Myc、LDHA 蛋白表达无显著性变化。

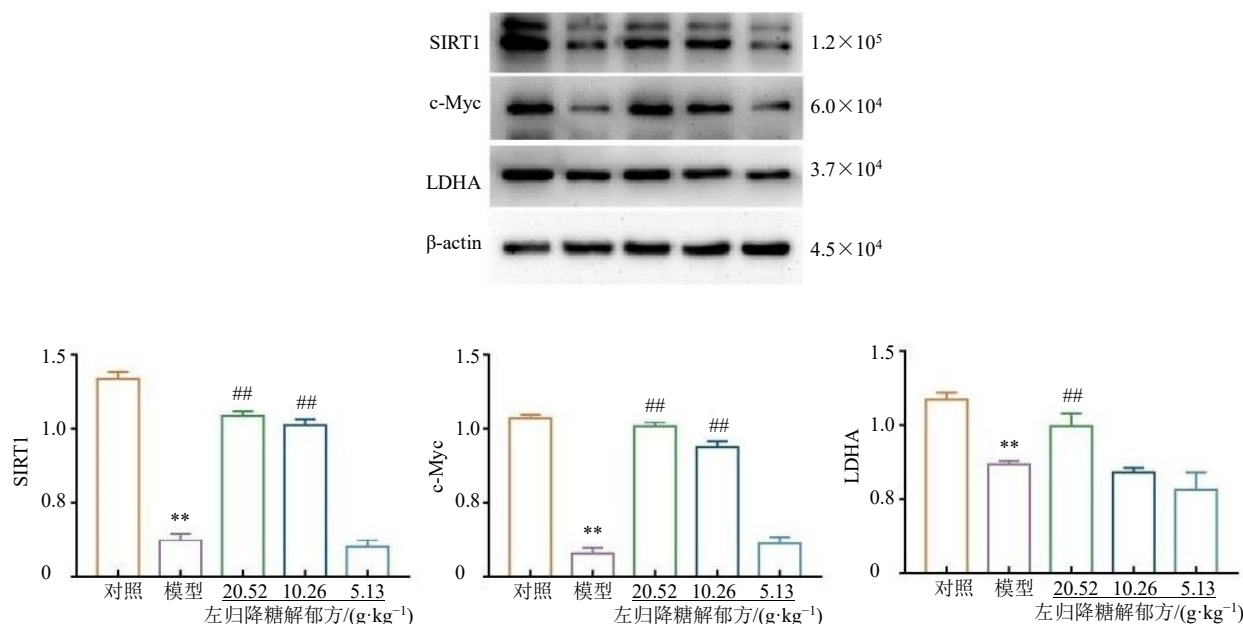


图 5 左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠海马 SIRT1、c-Myc、LDHA 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 5 Effect of Zuogui Jiangtang Jieyu Formula on expressions of SIRT1, c-Myc and LDHA proteins in hippocampus of rats with diabetes-related depression ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.5 抑制 SIRT1 活性影响左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠空腹血糖及胰岛素敏感性的调节作用

如图 6 所示,与左归降糖解郁方组比较,左归降糖解郁方+Sirtinol 组大鼠空腹血糖显著升高 ($P<0.01$),胰岛素敏感指数显著降低 ($P<0.01$),胰岛素抵抗指数显著升高 ($P<0.01$)。

3.6 抑制 SIRT1 活性影响左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠抑郁样行为和认知功能的调节作用

如图 7 所示,与左归降糖解郁方组比较,左归降糖解郁方+Sirtinol 组大鼠在强迫游泳实验中的不动时间显著增加 ($P<0.05$),在水迷宫实验中的登台时间显著延长 ($P<0.05$),在目标象限的路程比显著缩短 ($P<0.05$)。

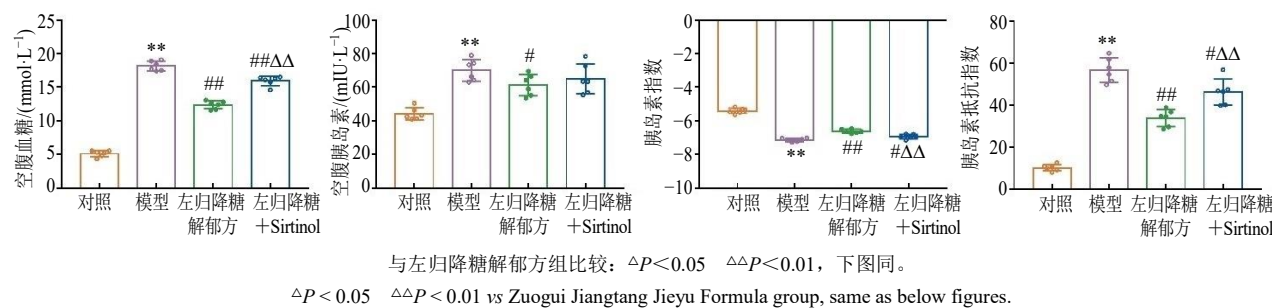


图 6 SIRT1 抑制剂对左归降糖解郁方改善糖尿病并发抑郁症大鼠空腹血糖及胰岛素敏感性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 6 Effect of SIRT1 inhibitor on improvement of fasting blood glucose and insulin sensitivity of rats with diabetes-related depression by Zuogui Jiangtang Jieyu Formula ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

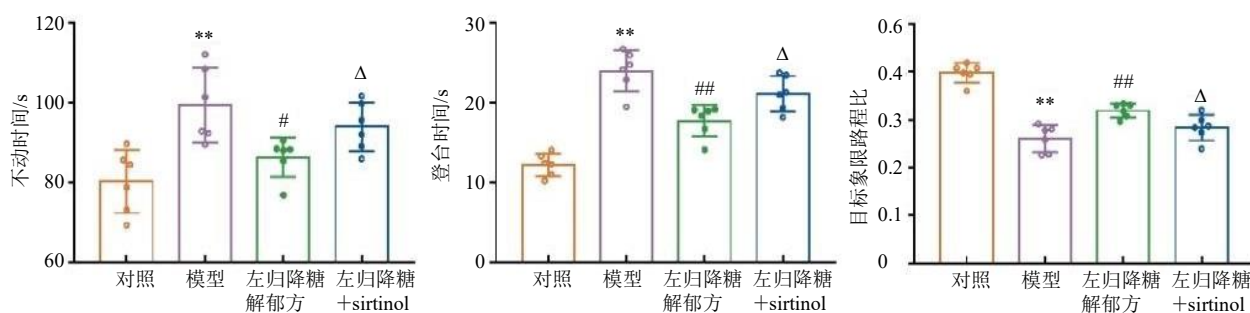


图 7 SIRT1 抑制剂对左归降糖解郁方改善糖尿病并发抑郁症大鼠抑郁样行为和认知功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 7 Effect of SIRT1 inhibitor on improvement of depressive-like behavior and cognitive function of rats with diabetes-related depression by Zuogui Jiangtang Jieyu Formula ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.7 抑制 SIRT1 活性影响左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠海马代谢物的调节作用

如图 8 所示,与对照组比较,模型组大鼠海马中乳酸、丙酮酸和 NAD^+ 含量显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,左归降糖解郁方组大鼠海马中乳酸、丙酮酸

和 NAD^+ 含量显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01),左归降糖解郁方+Sirtinol 组大鼠海马中丙酮酸和 NAD^+ 含量显著升高 ($P < 0.01$);与左归降糖解郁方组比较,左归降糖解郁方+Sirtinol 组大鼠海马中乳酸含量显著降低 ($P < 0.05$),丙酮酸和 NAD^+ 含量无显著性差异。

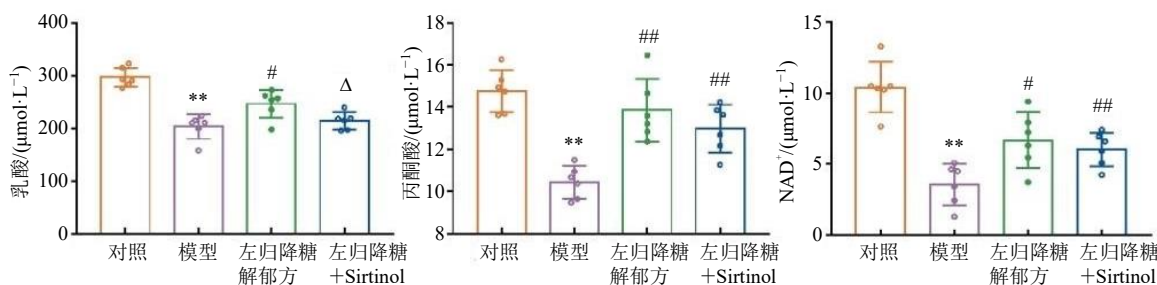


图 8 SIRT1 抑制剂对左归降糖解郁方改善糖尿病并发抑郁症大鼠海马代谢物水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 8 Effect of SIRT1 inhibitor on improvement of metabolites in hippocampus of rats with diabetes-related depression by Zuogui Jiangtang Jieyu Formula ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.8 抑制 SIRT1 活性影响左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠海马乳酸代谢通路的调节作用

如图 9 所示,与左归降糖解郁方组比较,左归降糖解郁方+Sirtinol 组大鼠海马中 SIRT1、c-Myc、LDHA 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.01$)。

4 讨论

目前,糖尿病并发抑郁症的临床治疗仍以药物治疗为主,以控制血糖波动和缓解抑郁症状为主要目标。但是,在实际用药过程中,药物不良反应不容忽视。部分抗抑郁药如度洛西汀和文拉法辛被发现可能增加患者的糖尿病风险^[10],而选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂虽然不会影响患者的葡萄糖代谢,但会导致患者骨骼肌肉的能量代谢和结构特性,增加跌倒和骨折风险^[11]。中药辨证论治,标本兼治,

具有较好的疗效,且不良反应少。中医认为糖尿病并发抑郁症属气阴两虚、血瘀肝郁^[12],左归降糖解郁方的君药熟地黄具有滋补肾阴的作用,臣药山茱萸和枸杞子具有加强君药滋补肾阴的作用,佐药菟丝子、牛膝、杜仲补肝肾,黄芪健脾益气,丹参和牡丹皮活血化瘀,姜黄和贯叶金丝桃化痰行气、疏肝解郁。本研究发现,左归降糖解郁方高、中剂量组可显著降低糖尿病并发抑郁症大鼠的空腹血糖和空腹胰岛素含量,改善胰岛素功能,而左归降糖解郁方低剂量组作用不明显,其降糖作用呈剂量相关性。在改善动物行为方面,左归降糖解郁方高、中剂量组可显著改善动物的抑郁样行为以及学习记忆功能,同样呈现剂量相关性。为挖掘左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠海马组织代谢的影响,

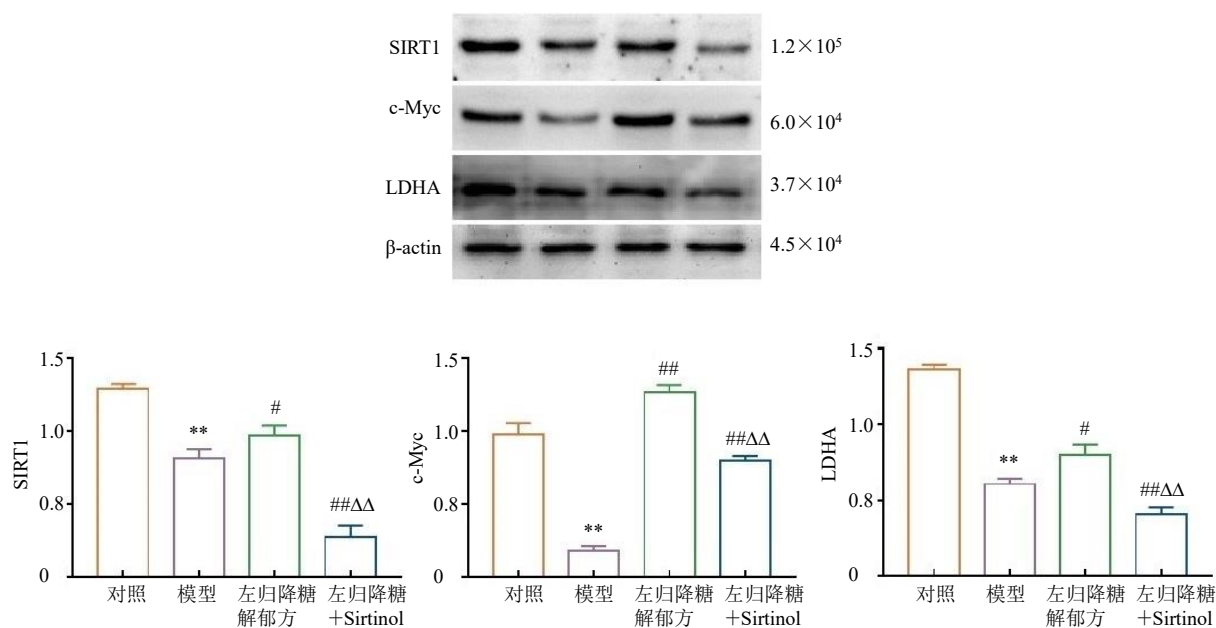


图 9 SIRT1 抑制剂对左归降糖解郁方改善糖尿病并发抑郁症大鼠海马 SIRT1、c-Myc 和 LDHA 蛋白表达的影响
($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 9 Effect of SIRT1 inhibitor on improvement of SIRT1, c-Myc and LDHA protein expressions in hippocampus of rats with diabetes-related depression by Zuogui Jiangtang Jieyu Formula ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

本研究对左归降糖解郁方高剂量组和模型组的海马组织进行了代谢组学检测 and 对比分析。采用 PCA 和 OPLS-DA 2 种方法对正、负离子模式下的代谢组数据进行了多元分析，结果表明 2 组数据的组内聚集性良好，组间距离较远，且数据无过拟合现象。随后，采用 KEGG、MetPA、MSEA 3 种分析方法分别对正、负离子模式下的代谢数据进行了分析。KEGG 是以差异代谢物为目标重点分析参与其中的所有代谢途径；MetPA 侧重分析整个代谢网络中具备重要作用的代谢通路，即核心代谢通路；MSEA 则重点分析微弱变化的代谢物（即非显著性差异代谢物）的富集情况^[13]。结果可见，正、负离子模式下，2 组的代谢通路富集情况截然不同。首先，在负离子模式下，采用 KEGG 和 MetPA 2 种富集方法，可见柠檬酸循环、丙酮酸代谢、磷酸戊糖途径等与糖代谢密切相关的通路富集，但该模式下微弱变化代谢物的 MSEA 富集结果中未见与糖代谢相关通路富集。而在正离子模式下，虽然在 KEGG 和 MetPA 2 种分析方法中未见与糖代谢相关通路富集，但在 MSEA 富集结果中可见葡萄糖新生、糖酵解、Warburg 效应、柠檬酸循环等糖代谢途径的富集。综上，与糖

代谢相关的代谢通路在负离子模式下主要富集在显著性差异的代谢物表达群中，而在正离子模式下则主要富集在微弱变化的代谢物表达群中。推测形成上述结果的原因可能为与糖代谢相关的代谢中间产物多带有负电荷，故在负离子模式下有更多响应，在差异代谢物表达群中可被 KEGG 和 MetPA 方法富集。而糖代谢产物中少量的带有正电荷的代谢产物则在正离子模式下被识别，并在 MSEA 分析方法中得到富集。至此，为了进一步明确代谢物的重要程度以及对于样本区分的贡献，选择了负离子模式下的代谢物进行了 VIP 分析，结果发现乳酸的贡献度最大，并推测海马糖酵解可能是糖尿病并发抑郁症防治的重要干预途径。

SIRT1 是一种 NAD^+ 依赖性去乙酰化酶，参与代谢、衰老、心血管等多种生物学过程。一方面，SIRT1 被认为是一种能量代谢感应器，通过靶向转录因子，调控能量代谢相关酶的表达^[14]；另一方面，SIRT1 基因位点是抑郁症相关的重要突变位点，抑郁症的发生与 SIRT1 的表达密切相关^[15]。最新的研究发现，SIRT1 参与糖酵解过程，但在不同疾病状态下 SIRT1 对糖酵解可能存在相反的作用。如在结

肠癌细胞中, SIRT1 可通过激活过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α , PGC-1 α) 抑制糖酵解基因的转录活性, 从而抑制糖酵解过程^[16]。而在膀胱癌中, SIRT1 增加了葡萄糖转运体 1 (glucose transporter 1, GLUT1) 的转录活性和表达, 进而增强了葡萄糖摄取和糖酵解活性^[17]。前期研究发现, 糖尿病并发抑郁症大鼠海马中 SIRT1 表达显著降低, 且可通过抑制脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 的表达, 降低神经营养, 从而造成海马神经元突触形态受损及突触棘密度减少^[18]。但 SIRT1 是否影响了糖尿病并发抑郁症海马糖酵解, 从而导致乳酸含量变化, 尚未见报道。有研究表明, 在 SIRT1 的启动子区存在 c-Myc 的结合位点, 而后者可调控下游靶基因 LDHA 的表达, 从而影响丙酮酸催化生成乳酸过程。本研究结果显示, 左归降糖解郁方高剂量组可显著增加糖尿病并发抑郁症大鼠海马中 SIRT1、c-Myc 和 LDHA 的表达, 推测左归降糖解郁方可能通过激活海马 SIRT1/c-Myc 信号, 促进下游靶基因 LDHA 表达, 催化丙酮酸转化为乳酸, 提高海马的糖酵解水平, 从而增加乳酸含量。

为了进一步验证左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠海马乳酸代谢及可能机制的调控作用, 采用 SIRT1 抑制剂 Sirtinol 对左归降糖解郁方的作用进行了干扰, 左归降糖解郁方的剂量选择为药效最为明显的高剂量即 20.52 g/kg 开展实验。对外周血糖和胰岛素活性的研究发现, Sirtinol 可以阻断左归降糖解郁方的降血糖作用, 干扰左归降糖解郁方对胰岛素敏感性和胰岛素抵抗的改善作用。对动物行为研究发现, 左归降糖解郁方干预的大鼠在 ip Sirtinol 后, 在强迫游泳实验中的不动时间显著延长, 在水迷宫实验中的学习和记忆表现显著受损。以上结果显示, 抑制 SIRT1 信号将影响左归降糖解郁方的降糖和抗抑郁双重作用。研究发现, SIRT1 可通过 FoxO1、自噬相关蛋白 7 (autophagy-related 7, ATG7) 等多种途径影响胰岛素敏感性, 改善胰岛素抵抗^[19-20]。故推测左归降糖解郁方的降糖作用可能与其调控胰岛 SIRT1 信号有关, 课题组将在后续实验中围绕上述假说展开研究。

SIRT1 与糖酵解过程密切相关。有氧糖酵解是大脑中的另一种重要的代谢方式。通常情况下, 葡萄糖通过糖酵解酶转化为丙酮酸, 同时产生 2 个三

磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 分子。随后, 丙酮酸可在线粒体中进行三羧酸循环和氧化磷酸化, 产生约 36 个 ATP 分子; 也可在胞质中在 LDHA 的作用下生成乳酸, 发挥供能、信号分子、乳酸化修饰等多种作用^[21]。本研究发现, 左归降糖解郁方可显著增加糖尿病并发抑郁症大鼠海马乳酸和丙酮酸含量, 但在抑制 SIRT1 后, 左归降糖解郁方对乳酸含量的改善作用明显减弱, 但对丙酮酸含量没有影响, 推测 SIRT1 信号主要通过抑制 LDHA 表达, 导致丙酮酸转化为乳酸过程效能降低, 从而影响了乳酸的生成, 但不影响丙酮酸的生成。此外, 由于 SIRT1 是 NAD⁺依赖性去乙酰化酶, 故本研究也对 NAD⁺含量进行了研究, 结果发现, 左归降糖解郁方可显著增加 NAD⁺含量, 且在抑制 SIRT1 后, 左归降糖解郁方对 NAD⁺的上述作用仍然存在。推测 Sirtinol 抑制了 SIRT1 的活性, 导致即使左归降糖解郁方升高了 NAD⁺的含量, 也无法依赖性地激活 SIRT1。对 SIRT1 信号通路相关蛋白表达研究发现, 左归降糖解郁方可升高糖尿病并发抑郁症大鼠海马中 SIRT1、c-Myc 和 LDHA 的表达, 但上述作用被 Sirtinol 的抑制作用阻断。

综上, 左归降糖解郁方改善了糖尿病并发抑郁症大鼠海马的乳酸代谢, 其作用机制与调控 SIRT1/c-Myc/LDHA 信号通路、促进丙酮酸催化为乳酸有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Basiri R, Seidu B, Rudich M. Exploring the interrelationships between diabetes, nutrition, anxiety, and depression: Implications for treatment and prevention strategies [J]. *Nutrients*, 2023, 15(19): 4226.
- [2] Li J J, Liu B B, Cai M, *et al.* Glucose metabolic alterations in hippocampus of diabetes mellitus rats and the regulation of aerobic exercise [J]. *Behav Brain Res*, 2019, 364: 447-456.
- [3] Soya M, Jesmin S, Shima T, *et al.* Dysregulation of glycogen metabolism with concomitant spatial memory dysfunction in type 2 diabetes: Potential beneficial effects of chronic exercise [J]. *Adv Neurobiol*, 2019, 23: 363-383.
- [4] Wu A, Lee D, Xiong W C. Lactate metabolism, signaling, and function in brain development, synaptic plasticity, angiogenesis, and neurodegenerative diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(17): 13398.
- [5] 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.
- [6] Yang H, Ling J, Meng P, *et al.* Activation of hippocampal IR/IRS-1 signaling contributes to the treatment with Zuogui Jiangtang Jieyu Decoction on the diabetes-related depression [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 6688723.
- [7] Pellerin L, Magistretti P J. Sweet sixteen for ANLS [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2012, 32(7): 1152-1166.
- [8] 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 Complement Alternat Med*, 2018, 2018: 2901863.
- [9] Kaur H, Kumar A, Jaggi A S, *et al.* Pharmacologic investigations on the role of Sirt-1 in neuroprotective mechanism of postconditioning in mice [J]. *J Surg Res*, 2015, 197(1): 191-200.
- [10] Nguyen T T H, Roussin A, Rousseau V, *et al.* Role of serotonin transporter in antidepressant-induced diabetes mellitus: A pharmacoepidemiological-pharmacodynamic study in VigiBase® [J]. *Drug Saf*, 2018, 41(11): 1087-1096.
- [11] Rasmussen N H, Dal J, den Bergh J V, *et al.* Increased risk of falls, fall-related injuries and fractures in people with type 1 and type 2 diabetes-A nationwide cohort study [J]. *Curr Drug Saf*, 2021, 16(1): 52-61.
- [12] 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.
- [13] Contaifer D Jr, Buckley L F, Wohlford G, *et al.* Metabolic modulation predicts heart failure tests performance [J]. *PLoS One*, 2019, 14(6): e0218153.
- [14] 王凡, 刘一平. Sirt1 对能量代谢的调控作用 [J]. 自然杂志, 2020, 42(6): 487-493.
- [15] CONVERGE consortium. Sparse whole-genome sequencing identifies two loci for major depressive disorder [J]. *Nature*, 2015, 523(7562): 588-591.
- [16] Vellinga T T, Borovski T, de Boer V C J, *et al.* SIRT1/PGC1 α -dependent increase in oxidative phosphorylation supports chemotherapy resistance of colon cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(12): 2870-2879.
- [17] Chen J, Cao L, Li Z Q, *et al.* SIRT1 promotes GLUT1 expression and bladder cancer progression via regulation of glucose uptake [J]. *Hum Cell*, 2019, 32(2): 193-201.
- [18] 杨蕙, 王宇红, 杜青, 等. 左归降糖解郁方通过调控 SIRT1/TORC1 通路增加糖尿病并发抑郁症大鼠海马神经元树突棘密度 [J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(3): 400-407.
- [19] 魏桂梅, 任锐, 赵璐, 等. 薯蓣皂苷通过调控 SIRT1-FoxO1-自噬通路减轻糖尿病大鼠胰岛素抵抗 [J]. 中国病理生理杂志, 2022, 38(2): 303-310.
- [20] 易璇, 陈丽, 王静芝, 等. 电针对胰岛素抵抗大鼠肝脏组织 SIRT1/ATG7 信号通路的影响 [J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2023, 52(2): 212-217.
- [21] Sharma R, Smolkin R M, Chowdhury P, *et al.* Distinct metabolic requirements regulate B cell activation and germinal center responses [J]. *Nat Immunol*, 2023, 24(8): 1358-1369.

[责任编辑 李亚楠]