

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00137

津力达颗粒对糖尿病大鼠海马组织的保护作用

李 斐, 赵 瑛*

第二军医大学长征医院神经内科, 上海 200003

[摘要] **目的** 探讨津力达颗粒对糖尿病大鼠海马组织的保护作用。**方法** 采用高脂饮食、链脲佐菌素腹腔一次性注射诱发 SD 大鼠糖尿病模型, 随机分为模型组、津力达不同剂量(0.75、1.5、3.0 g/kg)治疗组、 α -硫辛酸组、胰岛素组, 另设正常对照组。8 周后, 通过 Morris 水迷宫实验测试大鼠学习记忆能力, 然后处死大鼠取海马组织, 采用 TUNEL 法检测凋亡细胞, 透射电镜下观察超微结构, 并测定海马组织中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)、髓过氧化物酶(MPO)活性和丙二醛(MDA)含量。**结果** 糖尿病大鼠成模后 8 周出现学习记忆功能障碍, 除低剂量津力达组外, 各药物治疗组的学习记忆功能均有不同程度的改善。与正常对照组比较, 模型组大鼠海马 CA1 区出现较多的凋亡细胞, 超微结构明显破坏, SOD、GSH 活性降低($P<0.05$), MPO 活性和 MDA 水平升高($P<0.05$)。与模型组相比, 各药物治疗组大鼠海马 CA1 区凋亡细胞均有不同程度的减少, 海马神经元的超微结构破坏程度均有不同程度的减轻; 除津力达低、中剂量组外, 其余各药物治疗组 SOD、GSH 活性均升高($P<0.05$), MPO 活性均降低($P<0.05$), 其中津力达高剂量组与 α -硫辛酸组效果相当。**结论** 津力达颗粒对糖尿病大鼠海马组织具有保护作用。

[关键词] 津力达颗粒; 糖尿病; 海马; 氧化应激

[中图分类号] R 587.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)02-0137-05

Protective effect of *Jinlida* granules on hippocampus of diabetic rats

LI Fei, ZHAO Ying*

Department of Neurology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effect of *Jinlida* granules on hippocampus of diabetic rats. **Methods** Diabetic models were induced by high-fat diet and intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) in SD rats. The study was divided into diabetic model group, *Jinlida* granule groups (0.75, 1.5, and 3.0 g/kg), α -lipoic acid group and insulin group. Healthy rats served as normal controls. Rats were tested in Morris water maze after 8 weeks of treatment, and then the hippocampus tissues were taken from each group and were subjected to TUNEL assay and transmission electron microscopy (TEM) observation. The activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH), myeloperoxidase (MPO), and the contents of malondialdehyde (MDA) were all examined. **Results** The diabetic rats developed studying and memory disorders 8 weeks after establishment. Except for those in the low-dose *Jinlida* group, rats in other treatment groups had improved studying and memory functions to different extents. Compared with normal control group, rats in the model group had more apoptotic neurons in the hippocampal CA1 area, prominent ultrastructure damage, significantly decreased SOD and GSH activities ($P<0.05$), and significantly increased MPO activity and MDA level ($P<0.05$). Compared with the model group, rats in all the treatment groups had decreased apoptosis and less ultrastructure damage; and rats in high-dose *Jinlida* group, α -lipoic acid group and insulin group had significantly increased SOD and GSH activities and significantly decreased MPO activity in the hippocampal CA1 area ($P<0.05$); and the high-dose *Jinlida* granule group had a similar effect to α -lipoic acid group. **Conclusion** *Jinlida* granule can protect the hippocampus of diabetic rats.

[Key words] *Jinlida* granule; diabetes mellitus; hippocampus; oxidative stress

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(2):137-141]

[收稿日期] 2012-11-06 **[接受日期]** 2013-01-23

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(“973”计划, 2005CB523304). Supported by National Program on Key Basic Research (“973” Project, 2005CB523304).

[作者简介] 李 斐, 硕士生, 住院医师. E-mail: lifei19860711@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81885457, E-mail: zmliu_yzhao@hotmail.com

糖尿病认知功能障碍是以获得性认知行为缺陷为特征的糖尿病慢性并发症,其发生、发展所涉及的分子生物学机制尚不清楚。中医学上,将其归属于“消渴”病合并呆病、健忘等范畴,病机是脏腑阴虚为本,病位在肺、脾、肾三脏,病久阴虚及阳,则三脏亏虚,功能失调,运化水湿功能减弱,加剧痰浊形成。故治疗的重点为健脾益气,消痰利湿^[1]。津力达颗粒是以人参、黄精、苍术、苦参、麦冬、地黄、制何首乌、山茱萸、茯苓、佩兰、黄连、知母、淫羊藿(炙)丹参为成分,主要功用为益气养阴、健脾运津,用于气阴两虚证,具有治疗消渴之功效。本研究旨在观察津力达颗粒对2型糖尿病大鼠认知功能及海马组织的保护作用,并从氧化应激角度初步探讨其机制,为将该药应用于糖尿病认知功能障碍的治疗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 动物 雄性SD大鼠,SPF级,35日龄,体质量150~160 g,由第二军医大学实验动物中心提供,环境温度 $20\sim 25^{\circ}\text{C}$,湿度为56%,自由饮水,12 h/12 h昼夜交替,喂食时间为每日下午5:00至次日上午8:00。饲养笼具、垫料、饲料、饮水均按SPF级实验动物的要求进行制备与消毒。大鼠适应性饲养2 d后,禁食不禁水12 h,称体质量,取血测血糖等指标作为基础值。

1.2 药品与试剂 津力达颗粒(河北以岭药业集团有限公司,批号201100610);诺和灵N(诺和诺德制药有限公司,批号:J20110311); α -硫辛酸、链脲佐菌素(streptozotocin,STZ)、羟甲基纤维素钠、柠檬酸及柠檬酸钠均购于Sigma公司。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)试剂盒(南京建成生物工程研究所);谷胱甘肽(GSH)、髓过氧化物酶(MPO)试剂盒(南京建成生物工程研究所);丙二醛(malondialdehyde,MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所);寡核苷酸末端脱氧核糖转移酶(TdT)介导的dUTP缺口末端标记法(TUNEL)凋亡检测试剂盒(上海捷瑞生物科技有限公司)。2%戊巴比妥钠溶液(国药集团化学试剂有限公司);高脂饲料(胆固醇2.5%、胆酸钠0.2%、猪油5%、蔗糖5%);中国科学院上海分院);普通饲料(第二军医大学实验动物中心)。

1.3 造模与分组 将90只SPF级SD大鼠以普通饲料适应性喂养1周后,随机取出10只作为正常对照组,全程以普通饲料喂养;其余大鼠改为高脂饲料

喂养4周后,禁食不禁水12 h,测大鼠体质量,按30 mg/kg剂量一次性腹腔注射STZ(0.1 mmol/L柠檬酸盐缓冲液配制,pH 4.2~4.5,现用现配,30 min内注射完毕)。以血糖 $>16.7\text{ mmol/L}$ 确定为造模成功,3 d后尾尖采血验证模型是否成功,不成功者再次按10~20 mg/kg剂量注射STZ。将造模成功的大鼠随机分为模型组、津力达低剂量组(0.75 g/kg)、津力达中剂量组(1.5 g/kg)、津力达高剂量组(3.0 g/kg)、 α -硫辛酸组(50 mg/kg)、胰岛素组(诺和灵N,1.5 U/kg),每组10只大鼠。除胰岛素采用皮下注射外,其他药物均采用0.5%羟甲基纤维素钠溶解均匀后灌胃给药。正常对照组与模型组均用同等体积的羟甲基纤维素钠灌胃。每日给药1次,连续处理2个月。

1.4 检测指标

1.4.1 Morris水迷宫实验 成模8周后,在直径约150 cm的圆形水池中,设置直径约10 cm、高15 cm的平台,平台表面低于水面2 cm,先通过4 d的训练让大鼠熟悉并游至平台上。第5天隐藏平台,通过记录分析系统分析处理大鼠寻找平台的潜伏期,考察学习记忆能力。

1.4.2 TUNEL法检测海马区细胞凋亡 脱臼法处死大鼠,快速分离海马,将右侧海马置于 -80°C 冰箱,24 h后取出标本,用冰冻切片机将标本切成5 μm 厚的切片,贴于涂有多聚氨基酸的载玻片上,用4%的多聚甲醛液固定20 min,其余步骤按照说明书的操作程序进行,光镜下观察结果。

1.4.3 透射电镜观察海马区超微结构 取大鼠海马组织, 4°C 下用锋利刀片取约2 mm^3 组织块,经2.5%戊二醛及1%锇酸双重固定后,丙酮逐级脱水,树脂包埋,做超薄切片,厚度为50 nm,醋酸铀和柠檬酸铅双重染色后,用JEM1230型透射电镜观察并拍照。

1.4.4 海马组织SOD、MPO、GSH活性和MDA含量的测定 取大鼠海马组织,滤纸吸干,剪碎后置于匀浆器中,按照各试剂盒说明书步骤检测SOD、MPO、GSH活性和MDA含量。

1.5 统计学处理 应用SPSS 17.0统计软件进行统计学分析。数据以 $\bar{x}\pm s$ 形式表示,多组间比较采用单因素方差分析。检验水平(α)为0.05。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况 正常对照组大鼠一般情

况良好,精神状态佳,活动自如,毛发光泽,饮食及大小便正常;模型组大鼠一般情况较差,精神萎靡,行动迟缓,毛发杂乱无光,出现多饮、多食、多尿现象;各药物治疗组上述情况均有不同程度的改善。

2.2 Morris 水迷宫测试结果 与正常对照组相比,模型组大鼠寻找平台的潜伏期延长($P<0.05$);除津力达低剂量组外,各药物治疗组较模型组潜伏期均有不同程度的缩短($P<0.05$)。详见图 1。

2.3 光镜观察结果 由图 2A 可见,正常对照组海马 CA1 区神经元排列较规则、紧密,细胞界限清楚,细胞带较完整;模型组(图 2B)海马 CA1 区细胞排列散乱,稀疏分布不均匀,神经细胞脱失严重,并可观察到较多颜色棕染的凋亡细胞。各药物治疗组(图 2C~2G)的情况较模型组均有不同程度的改善,其中津力达中剂量(图 2D)和高剂量组(图 2E)、 α -硫辛酸组(图 2F)及胰岛素组(图 2G)改善显著。

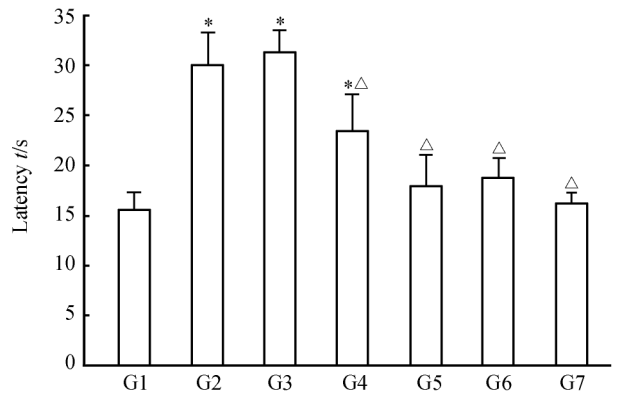


图 1 各组大鼠 Morris 水迷宫测试结果

Fig 1 Results of Morris water maze test in rats of each group

G1: Control group; G2: Model group; G3: *Jinlida* 0.75 g/kg group; G4: *Jinlida* 1.5 g/kg group; G5: *Jinlida* 3.0 g/kg group; G6: α -lipoic acid group; G7: Insulin group. * $P<0.05$ vs control group; $\Delta P<0.05$ vs model group. $n=10$, $\bar{x}\pm s$

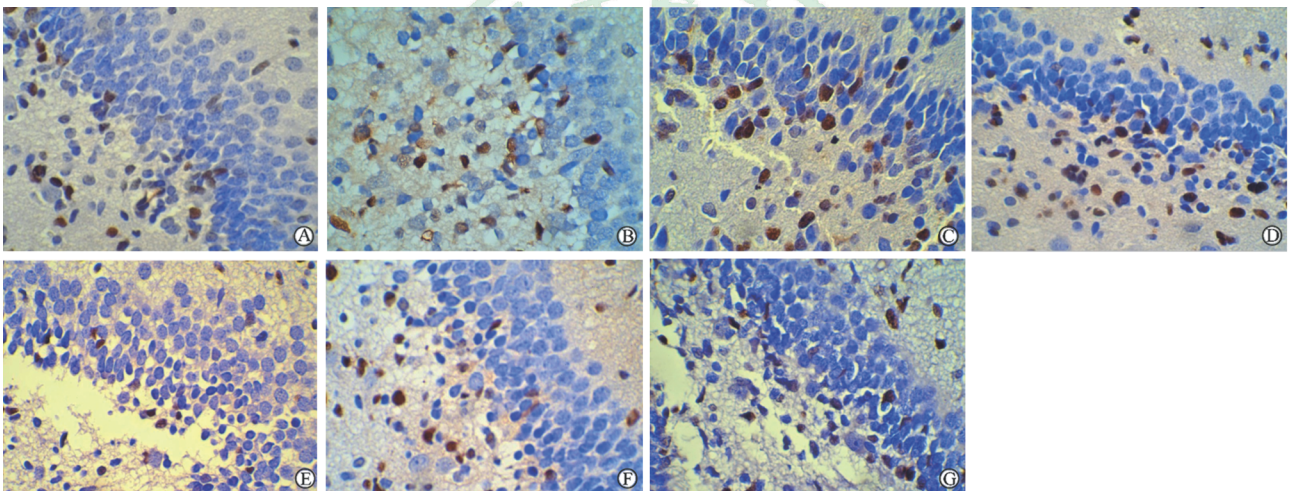


图 2 各组大鼠海马组织 TUNEL 染色结果

Fig 2 TUNEL staining results of rat hippocampus in each group

A: Control group; B: Model group; C: *Jinlida* 0.75 g/kg group; D: *Jinlida* 1.5 g/kg group; E: *Jinlida* 3.0 g/kg group; F: α -lipoic acid group; G: Insulin group. Original magnification: $\times 400$

2.4 透射电镜观察结果 由图 3A 可见,正常对照组细胞核染色质分布较均匀,大部分线粒体结构完整,偶见线粒体嵴破坏;模型组(图 2B)细胞结构欠清晰,细胞核有凝集现象,有较多线粒体结构不完整,线粒体嵴破坏;津力达低剂量组(图 2C)部分细胞核染色质凝集,部分细胞核染色质分布不均匀,大部分线粒体结构完整,少量线粒体嵴破坏;津力达中剂量组(图 2D)部分细胞核染色质聚集,呈块状,大部分线粒体结构完整,少量线粒体嵴破坏;津力达高剂量组(图 2E)染色质凝集在细胞核边缘,分布不均

匀,部分线粒体嵴破坏; α -硫辛酸组(图 2F)染色质呈块状凝集,凝集的染色质主要分布在细胞核边缘,部分线粒体嵴破坏;胰岛素组(图 2G)部分细胞核染色质分布较均匀,部分细胞核染色质凝集,部分线粒体破坏,胞质内有少量空泡。

2.5 生化指标检测结果 由表 1 可见,模型组大鼠 SOD、GSH 活性降低, MPO 活性和 MDA 水平升高,与正常对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$);津力达中、高剂量组海马组织 SOD 活性较模型组升高,高剂量的津力达还能有效提高 GSH 水

平、降低 MPO 活性,其效果与 α -硫辛酸相当,但比胰岛素略差;但对于 MDA 水平,除胰岛素组效果显

著外 ($P < 0.05$),其他各组药物对其均无明显作用。

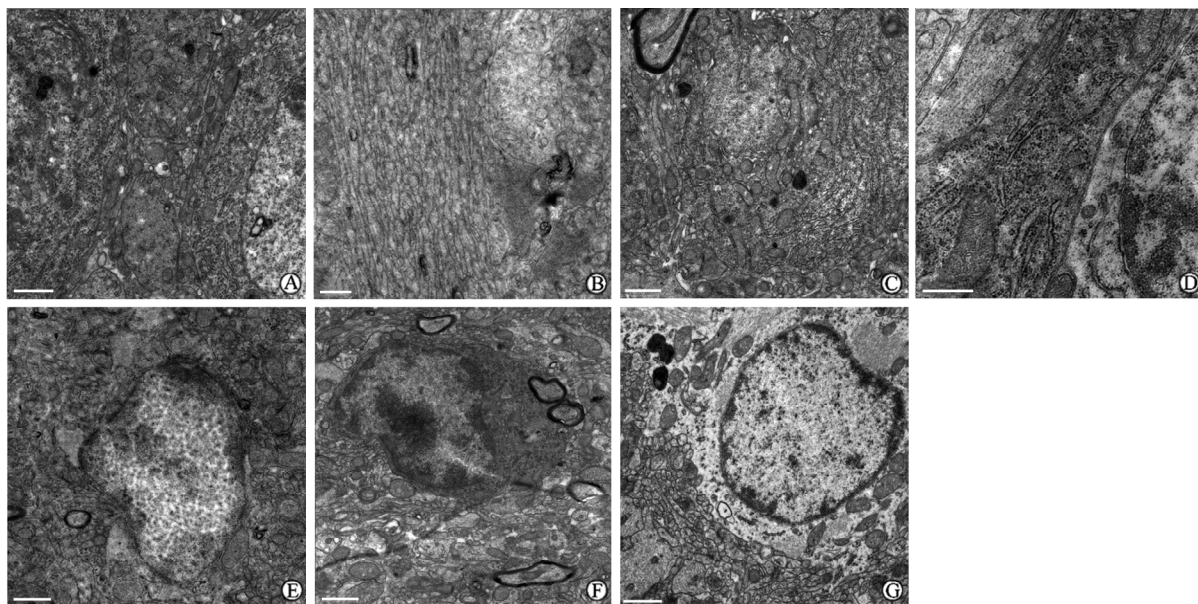


图 3 各组大鼠海马组织电镜图片

Fig 3 Electron microscopy images of hippocampus tissues in rats of each group

A: Control group; B: Model group; C: *Jinklida* 0.75 g/kg group; D: *Jinklida* 1.5 g/kg group; E: *Jinklida* 3.0 g/kg group; F: α -lipoic acid group; G: Insulin group. Bar=1 μm (A-C, E-G); Bar=0.5 μm (D)

表 1 各组大鼠海马组织 SOD、MDA、MPO 和 GSH 的变化

Tab 1 Changes of SOD, MDA, MPO and GSH in hippocampus tissues of rats in each group

Group	SOD	MDA	MPO	GSH
	$z_B / (\text{U} \cdot \text{mg}^{-1})$	$m_B / (\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1})$	$z_B / (\text{U} \cdot \text{mg}^{-1})$	$w_B / (\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$
Control	12.92 ± 1.53	0.13 ± 0.03	0.30 ± 0.02	3.61 ± 0.17
Model	3.15 ± 0.98*	1.12 ± 0.24	0.64 ± 0.05*	0.80 ± 0.12*
<i>Jinklida</i> 0.75 g/kg	3.60 ± 0.66*	1.05 ± 0.15*	0.65 ± 0.05*	1.05 ± 0.14* Δ
<i>Jinklida</i> 1.5 g/kg	4.79 ± 1.09* Δ	0.90 ± 0.11*	0.70 ± 0.07*	0.96 ± 0.15*
<i>Jinklida</i> 3.0 g/kg	5.07 ± 0.85* Δ	0.95 ± 0.18*	0.53 ± 0.04* Δ	1.59 ± 0.17* Δ
α -lipoic acid	5.66 ± 0.42* Δ	0.78 ± 0.05*	0.56 ± 0.07* Δ	1.92 ± 0.32* Δ
Insulin	6.86 ± 1.13* Δ	0.58 ± 0.09* Δ	0.38 ± 0.04* Δ	2.42 ± 0.20* Δ

$n=10, \bar{x} \pm s$

SOD: Superoxide dismutase; MDA: Malondialdehyde; MPO: Myeloperoxidase; GSH: Glutathione. * $P < 0.05$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs model group

3 讨论

神经心理及神经电生理研究结果均提示,糖尿病是认知功能障碍的独立危险因素^[2]。而海马区与大脑学习记忆功能密切相关,其损伤会严重影响动物的学习记忆功能。本实验采用 Morris 水迷宫检测各组大鼠学习记忆能力,并采用 TUNEL 法检测各组大鼠海马细胞的凋亡情况,通过透射电镜技术观察海马神经元超微结构,了解 2 型糖尿病大鼠认知功能改变和海马神经元的损害程度,以及相关药物的保护作用。Morris 水迷宫结果显示,模型组大

鼠潜伏期明显延长,除津力达低剂量组外,其余各药物治疗组均能不同程度地改善大鼠的认知功能,尤其是津力达高剂量组、 α -硫辛酸组及胰岛素组效果显著;光镜下观察到模型组的海马神经细胞凋亡明显,神经元排列稀疏紊乱,药物治疗后各组均有不同程度的改善;电镜下可见模型组大鼠海马区细胞结构欠清晰,细胞核有凝集现象,有较多线粒体结构不完整,线粒体嵴破坏,各治疗组海马神经元的超微结构均有不同程度的改善。上述结果提示高糖环境可以对海马组织造成明显的损害,而这种损害很可能是导致糖尿病认知障碍的直接因素。而中、高剂量

津力达颗粒对维持2型糖尿病大鼠海马组织正常结构具有明显的保护作用,且高剂量组津力达颗粒的保护作用与 α -硫辛酸及胰岛素的效果相当。

氧化应激是指细胞或组织中活性氧(ROS)的产生超出其本身的抗氧化能力,从而导致组织损伤的一种状态。目前学界普遍认为,氧化应激是糖尿病及其并发症形成的主要启动因素^[3]。糖尿病糖代谢紊乱引起葡萄糖的有氧氧化、蛋白的非酶糖基化作用加强以及脂代谢异常等均可导致ROS产生增加^[4-6],而大脑是对脂质过氧化物较敏感的器官,过多的ROS可导致神经元线粒体内膜上的脂类、蛋白和线粒体DNA损害,最终导致细胞内能量衰竭和细胞死亡,引起认知功能障碍^[7]。本实验选取SOD、MDA、GSH、MPO作为氧化还原相关指标。SOD是一种肽链大分子金属酶,能催化超氧化物阴离子歧化为过氧化氢与氧气,其活力的高低可间接反映机体清除氧自由基的能力^[8]。MDA作为氧自由基与生物膜不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应的代谢产物,其含量的变化间接地反映了组织中氧化自由基含量的变化,通过测定MDA含量可以估计海马组织中氧自由基水平和脂质过氧化反应的强弱^[9]。MPO主要存在于单核细胞和中性粒细胞中,参与体内I相代谢,外界刺激可导致中性粒细胞的聚集,在聚集部位释放大量MPO,可启动脂质过氧化;GSH的作用是减少自由基的产生,防止脂质过氧化及其代谢产物对机体的损害,其活性降低可导致氧自由基产生增加和细胞自由基清除酶的活力下降,造成神经细胞脂质过氧化的发生^[10]。本实验结果显示,2型糖尿病大鼠模型海马组织中SOD活性及GSH水平降低,MDA水平及MPO活性增高,提示氧化应激在糖尿病海马损害中发挥了作用。而津力达中、高剂量组用药后可改善机体抗氧化应激能力,减少氧化应激损伤。尤其是津力达高剂量组其抗氧化应激的能力可与 α -硫辛酸相媲美,两者对于以上各氧化应激指标的调节作用相当。但同时,本实验结果也提示,津力达和 α -硫辛酸无法替代胰岛素对糖尿病大鼠海马组织的保护作用。

综上所述,津力达颗粒能够有效增强海马组织的抗氧化应激能力,维持海马正常组织结构和细胞结构,从而抵制糖尿病对大鼠认知功能的损害。实验结果提示,中、高剂量的津力达颗粒单独使用,对2型糖尿病大鼠的海马组织具有明显保护作用,尤其是高剂量的津力达颗粒,其抗氧化应激及对海马组织的保护作用可以与 α -硫辛酸相媲美。但实验结果同时还显示津力达颗粒单独使用对海马的保护作用

是有限的,提示津力达颗粒联合传统的糖尿病治疗药物,如二甲双胍、胰岛素,可能会多途径的、更有效地控制血糖和可能的氧化应激损伤,从而使海马组织获得更好的保护。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 陈文静,黄小波. 2型糖尿病认知功能障碍中西医结合研究进展[J]. 中国中医药信息杂志,2012,19:106-110.
- [2] Yates K F, Sweat V, Yau P L, Turchiano M M, Convit A. Impact of metabolic syndrome on cognition and brain: a selected review of the literature[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*,2012,32:2060-2067.
- [3] Da Costa L A, Badawi A, El-Sohehy A. Nutrigenetics and modulation of oxidative stress [J]. *Ann Nutr Metab*,2012,60(Suppl 3):27-36.
- [4] Maiese K, Chong Z Z, Shang Y C. Mechanistic insights into diabetes mellitus and oxidative stress[J]. *Curr Med Chem*,2007,14:1729-1738.
- [5] Muralidhara S B. Occurrence of oxidative impairments, response of antioxidant defences and associated biochemical perturbations in male reproductive milieu in the streptozotocin-diabetic rat[J]. *Int J Androl*,2007,30:508-518.
- [6] Shen G X. Oxidative stress and diabetic cardiovascular disorders: roles of mitochondria and NADPH oxidase [J]. *Can J Physiol Pharmacol*,2010,88:241-248.
- [7] Baño Ojalora B, Popovic N, Gambini J, Popovic M, Viña J, Bonet-Costa V, et al. Circadian system functionality, hippocampal oxidative stress, and spatial memory in the APP^{swe}/PS1^{dE9} transgenic model of Alzheimer disease: effects of melatonin or ramelteon[J]. *Chronobiol Int*,2012,29:822-834.
- [8] Li H, Park J H, Lee J C, Yoo K Y, Hwang I K, Lee C H, et al. Neuroprotective effects of *Alpinia katsumadai* against experimental ischemic damage via control of oxidative stress[J]. *Pharm Biol*,2013,51:197-205.
- [9] Nair D, Ramesh V, Gozal D. Adverse cognitive effects of high-fat diet in a murine model of sleep apnea are mediated by NADPH oxidase activity [J]. *Neuroscience*,2012,227:361-369.
- [10] Li Q, Chen M, Liu H, Yang L, Yang G. Expression of APP, BACE1, AChE and ChAT in an AD model in rats and the effect of donepezil hydrochloride treatment[J]. *Mol Med Report*,2012,6:1450-1454.