·重大新药创制专项巡礼·

二甲双胍联合小檗碱对 db/db 小鼠糖尿病认知功能障碍的改善作用

曹月盈[1,2],孟祥宝[3,4,5],孙桂波[3,4,5],孙晓波[3,4,5],孙　懿[1,2],赵　欣[1,2],蒲小平[1,2]

(北京大学 1 药学院分子与细胞药理学系,2 天然药物及仿生药物国家重点实验室,北京 100191;
中国医学科学院北京协和医学院 3 药用植物研究所,4 中草药生物活性物质及资源利用重点实验室,
5 国家中医药管理局中药抗糖脂代谢紊乱疗效评估重点实验室,北京 100193)

[摘要] **目的**:利用 db/db 转基因小鼠模型探究二甲双胍联合小檗碱对糖尿病认知功能障碍的改善作用。**方法**:将 db/db 小鼠随机分为模型组(M)、二甲双胍给药组(Mt)、小檗碱给药组(Bb)和二甲双胍联合小檗碱给药组(MB),将同窝出生的 db/m 小鼠设为空白对照组(C)。分别灌胃给药二甲双胍(300 mg·kg^{-1})、小檗碱(135 mg·kg^{-1})、二甲双胍联合小檗碱(300 mg·kg^{-1} + 135 mg·kg^{-1})10 周,测定各组 db/db 小鼠体重、血糖及其相关指标、行为学、氧化应激和炎症因子相关指标;并用苏木素-伊红染色处理脑组织切片,光镜观察病理学改变;利用基质辅助激光解析电离质谱成像(matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry imaging, MALDI-TOF-MSI)技术观察小鼠脑组织代谢小分子含量的变化。**结果**:MB 组小鼠空腹血糖值明显低于 M 组,且低于 Mt 和 Bb 组小鼠血糖。水迷宫实验中,和 M 组小鼠比较,MB 组小鼠逃避潜伏期和从对侧象限入水找到平台的时间明显变短;90 s 内穿台次数和在目标象限中停留时间明显增多。在外周血清 ELISA 测定中,MB 组小鼠对比 M 组小鼠 HbA1c,8-OHdG,PCO,TNF-α,NLRP3 和 IL-1β 水平均明显降低,IL-6 水平明显升高。在 HE 染色实验中,和 M 组小鼠比较,MB 组小鼠脑海马区中神经细胞排列整齐,形态较完整,核染色清晰,细胞间界限清楚。在质谱成像实验中,和 M 组小鼠比较,MB 组小鼠脑天冬氨酸、N-乙酰-天冬氨酸、谷氨酸水平明显上升且高于 Mt 和 Bb 组;牛磺酸、葡萄糖水平明显降低且低于 Mt 和 Bb 组。**结论**:本实验证明了二甲双胍联合小檗碱口服给药对糖尿病认知功能障碍有改善作用,且比单独给药二甲双胍或小檗碱效果更明显,其作用机制或与抗炎、抗氧化应激、改善 TCA 循环以及提高兴奋性氨基酸水平等相关。

[关键词] db/db 小鼠;糖尿病认知功能障碍;二甲双胍;小檗碱;基质辅助激光解析电离质谱成像

[中图分类号] R965　　[文献标志码] A　　[文章编号] 1003 - 3734(2021)08 - 0690 - 11

Metformin plus berberine alleviates cognitive dysfunction in db/db mice

CAO Yue-ying[1,2], MENG Xiang-bao[3,4,5], SUN Gui-bo[3,4,5], SUN Xiao-bo[3,4,5],
SUN Yi[1,2], ZHAO Xin[1,2], PU Xiao-ping[1,2]

(1 *Department of Molecular and Cellular Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences*, 2 *State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, Peking University, Beijing* 100191, *China*; 3 *Institute of Medicinal Plants*, 4 *Key Laboratory of Bioactive Substances and Resource Utilization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education*, 5 *Key Laboratory of Efficacy Evaluation of Chinese Medicine Against Glycolipid Metabolic Disorders, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing* 100193, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To explore the protective effects of metformin plus berberine against diabetes-

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目(2017ZX09101003-009-006)

[作者简介] 曹月盈,女,硕士研究生,主要从事药理学研究工作。E-mail: bingyingbjsz@163.com。

[通讯作者] 蒲小平,女,教授,博士生导师,主要从事神经药理学研究。联系电话:(010)82802431,E-mail: puxi-aopingbj@163.com。赵欣,女,博士,讲师,主要从事神经药理学研究。联系电话:(010)82802648,E-mail: zhaoxin2010@bjmu.edu.cn。

induced cognitive dysfunction in db/db mice. **Methods**: Mice were randomly divided into model, metformin, berberine, and metformin plus berberine (MB) groups. Db/m mice born in the same litter were used as the control group. Metformin (300 mg·kg^{-1}) and berberine (135 mg·kg^{-1}), either alone or in combination, were administered orally for 10 weeks. Body weight, blood glucose and related indices, and behavioral, oxidative stress-related, and inflammatory factor-related indexes of db/db mice were measured. Brain tissue sections were subjected to hematoxylin-eosin (HE) staining, and pathological changes were observed via light microscopy. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry was used to observe changes in the levels of small molecules in the brain tissue. **Results**: Fasting blood glucose levels were significantly lower in the MB group than in the model, metformin, and berberine groups after 8 and 10 weeks of dosing. In the Morris water maze test, escape latency and time to find the platform from the contralateral quadrant were significantly shorter in the MB group than in the model group. The number of target crossings in 90 s and residence time in the target quadrant significantly increased in the metformin plus berberine group. According to ELISA, glycated hemoglobin, 8-hydroxydeoxyguanosine, protein carbonyl, tumor necrosis factor-α, NLRP3, and interleukin-1β levels were significantly lower in the MB group than in the model group, whereas interleukin-6 levels significantly increased. In HE staining experiments, compared with the model group, the neurons in the hippocampal region in the metformin plus berberine group were arranged neatly, with more complete shape, clear nuclear staining, and clear cell boundaries. In mass spectrometry imaging experiments, brain aspartate, N-acetyl-aspartate, and glutamate levels were significantly higher in the MB group than in the model group, whereas taurine and glucose levels significantly decreased. **Conclusion**: Oral administration of MB has protective effects on diabetes-induced cognitive dysfunction and stronger effects than using either drug alone. The mechanism of action may be related to anti-inflammatory and antioxidative stress effects and increase in excitatory amino acids levels.

[**Key words**] db/db mice; diabetes-induced cognitive dysfunction; metformin; berberine; matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry imaging

糖尿病是一组以高血糖为特征的慢性代谢综合征[1-3]。糖尿病认知功能障碍作为其并发症之一，严重影响了人们的生活质量[4]。糖尿病认知功能障碍是由糖代谢紊乱引起的中枢神经系统损伤导致的认知衰退现象，其表现为学习记忆能力降低等[5]。尤以 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)患者的记忆力、学习能力和精神运动效率等下降为主[6]。随着人们生活方式的改变，2 型糖尿病患者日益增多，人类寿命的延长和人口老龄化的进程加快也导致这一并发症的发病率逐年升高。因此，如何预防及治疗糖尿病认知功能障碍成为当今医学领域的热门课题。

db/db 小鼠是近年来常用的研究 T2DM 及其并发症的小鼠模型，也是美国 FDA 推荐使用的动物研究模型。这种小鼠具有胰岛素抵抗、高胰岛素、高血糖等特点，和人类 T2DM 的病理特点很相似。目前，已经有研究明确显示，这种小鼠模型在 20 周龄即可出现明显的认知功能障碍[7]。

二甲双胍(metformin, Mt)为双胍类口服降血糖药，首选用于 T2DM 治疗。迄今已有超过 50 年的临床应用历史，已有多篇报道表明其对神经退行性疾病有治疗作用[8-9]。

小檗碱(berberine, Bb)，一种异喹啉类生物碱，临床上主要用于治疗胃肠炎、细菌性痢疾等肠道感染。近期有研究表明其具有抗炎、抗精神病、抗抑郁和抗遗忘作用。研究者们发现 Bb 的抗炎作用和调控内质网上应激反应蛋白的能力，对糖尿病老年小鼠模型的学习记忆能力损伤有保护作用[10]。

有文献报道，Mt 联合 Bb 给药对于糖尿病患者的降糖效果比单独给药更好[11]；可以更明显地降低 T2DM 患者血清炎症因子水平，改善患者胰岛素抵抗现象[12]。基于过往研究结果，Mt 联合 Bb 给药缺少对糖尿病认知功能障碍的药效研究，故而我们在本研究中，探究了 Mt 联合 Bb 给药对糖尿病认知功能障碍的影响。

基质辅助激光解析电离质谱成像(matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry imaging, MALDI-TOF-MSI)技术是一种能够在组织切片上原位检测代谢等小分子以及蛋白质等大分子含量和空间分布的方法。运用 MALDI-TOF-MSI

技术能够直接在原位组织上检测能量代谢、氧化应激等小分子的含量及分布[13]。这一技术在糖尿病认知功能障碍研究领域的应用,对于明确疾病状态下特定脑区代谢相关小分子含量变化及其药物的干预作用具有重要意义。

综上,本研究利用 db/db 转基因糖尿病小鼠模型,探究二甲双胍联合小檗碱对糖尿病认知功能障碍的改善作用及其机制。

材　料

1　试药和试剂

盐酸二甲双胍片(中美上海施贵宝制药有限公司产品,规格:0.5 g·片$^{-1}$ ×20 片,10 g·盒$^{-1}$);盐酸小檗碱片(东北制药集团沈阳第一制药有限公司产品,10 g·瓶$^{-1}$);门冬胰岛素 30 注射液(丹麦诺和诺德公司);葡萄糖溶液(北京拜尔迪生物技术有限公司);小鼠 8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)、蛋白质羰基(protein carbonyl)、炎症小体(NLRP3)、肿瘤坏死因子(TNF-α)、白细胞介素-1β(IL-1β)、白细胞介素-6(IL-6)、血清糖化血红蛋白(HbA1c)ELISA 试剂盒(北京冬歌博业生物科技有限公司);1,5-萘二胺(1,5-DAN,美国 Sigma 公司)。

2　仪器

CM1950 型冰冻切片机(德国 Leica 公司);270 mL 纳米喷雾加湿器(中国深圳洺歌电子科技有限公司);Autoflex speed MALDI-TOF-MSI 成像系统(德国 Bruker Daltonics 公司);Fleximaging 软件(德国 Bruker Daltonics 公司);SCiLS Lab 软件(德国 Bruker Daltonics 公司);稳豪型血糖仪(三诺生物传感股份有限公司)。

3　实验动物

10 周龄 db/db 雌性小鼠共 32 只和同窝出生的 db/m 雌性小鼠共 8 只,SPF 级,由南京大学-南京生物医药研究院提供,许可证编号:SCXK(苏)2018-0008。动物独立饲养,室温和湿度分别维持在 22 ℃ ~ 24 ℃和 50% ~60%,12 h/12 h 昼夜交替光照,适应性饲养 1 周,以下动物实验获得北京大学生物医学伦理委员会批准,批准号:LA2017282。

方　法

1　动物分组

将 db/db 小鼠随机分为 5 组:模型组(Model,M)、Mt 给药组、Bb 给药组、Mt 联合 Bb 给药组(MB)、同窝出生的 db/m 小鼠设为空白对照组(control,C),每组动物 8 只。

2　给药

Mt 组小鼠灌胃给予 Mt(300 mg·kg^{-1}),Bb 组小鼠灌胃给予 Bb 135 mg·kg^{-1},剂量的选择参考以往文献[14-15],并换算药品 LD_{50} 为等效剂量后进行预实验,根据预实验小鼠状态调整后确定。MB 组小鼠同时灌胃给予 Mt 300 mg·kg^{-1}和 Bb 135 mg·kg^{-1},*qd*,连续给药 10 周,C 组和 M 组小鼠每日灌胃给予等体积生理盐水,每 2 周测定 1 次小鼠体重。Mt 和 Bb 结构式如图 1 所示。

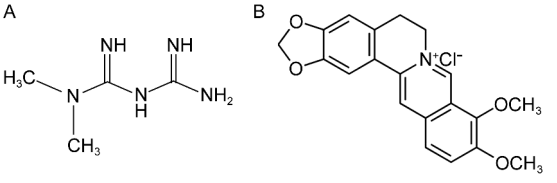


图 1　二甲双胍(A)和小檗碱(B)的结构式

3　Mt 联合 Bb 对 db/db 小鼠血糖及糖耐量等相关指标的影响

每 2 周测定 1 次小鼠空腹血糖值,小鼠禁食不禁水 5 h 后,尾静脉采血,用稳豪型血糖仪测定各组小鼠的血糖值。在最后一次给药后,分别检测口服葡萄糖耐量试验(oral glucose tolerance test,OGTT)和胰岛素耐量试验(insulin tolerance test,ITT)。OGTT 的检测方法为小鼠禁食不禁水隔夜后,根据小鼠体重,口服给予 1.0 g·kg^{-1}的葡萄糖溶液,检测并记录葡萄糖溶液灌胃后 0,30,60,90 和 120 min 时小鼠的血糖值。ITT 的检测方法为小鼠禁食不禁水 5 h 后,根据小鼠体重,颈皮下注射 0.75 U·kg^{-1}的胰岛素溶液,检测并记录注射后 0,30,60,90 和 120 min 时小鼠的血糖值[16]。行为学实验结束后,眶静脉采血 500 μL,3 500 r·min^{-1}离心 15 min,取上清液,利用小鼠糖化血红蛋白 ELISA 试剂盒检测血清 HbA1c 水平。

4　利用 Morris 水迷宫实验检测 Mt 联合 Bb 对 db/db 小鼠认知能力的影响

10 周给药结束后,进行行为学实验。利用 Morris 水迷宫实验评价小鼠的认知能力[17]。将平台置于第一象限,d 1 ~ d 4 进行定位航行实验,令每只小鼠从第二、三、四象限入水,记录小鼠从入水到找到平台的时间,即为逃避潜伏期。每只小鼠最长测试

90 s,找到平台或时间结束后使其在平台停留 20 s(未找到按 90 s 计时),每次游泳需间隔 1 h,逃避潜伏期用来反映小鼠的学习能力。d 5 进行空间探索实验,撤去平台后,将小鼠从第三象限入水,记录小鼠找到平台的时间、在 90 s 内穿越原平台位置的次数、记录小鼠在目标象限停留时间,用来评价小鼠的空间记忆能力[18]。

5 Mt 联合 Bb 对 db/db 小鼠氧化应激和炎症反应的影响

行为学实验结束后,采用 ELISA 法检测各组小鼠血清氧化应激指标 8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)、蛋白质羰基(protein carbonyl,PCO)水平和小鼠血清炎症反应因子指标肿瘤坏死因子(TNF-α)、白细胞介素-1β(IL-1β)、白细胞介素-6(IL-6)、炎症小体(NLRP3)水平。给药结束后,眶静脉采血 500 μL,3 500 r·min^{-1} 离心 15 min 取上清液,利用小鼠 ELLISA 试剂盒检测以上各个指标[19]。

6 Mt 联合 Bb 对 db/db 小鼠脑组织病理学的影响

行为学实验结束后,进行 HE 染色,检测脑组织病理学和形态学变化。用 10% 水合氯醛麻醉小鼠,PBS 灌流,摘取小鼠脑组织制作石蜡切片。小鼠脑组织以 4% 多聚甲醛溶液固定、脱水、置于二甲苯中透明,将透明后的组织包埋凝固,然后修块、切片、烤片。将石蜡切片脱蜡,用苏木精-伊红染色,脱水封片。最后使用 Motic DSAssistant Lite 软件进行图像采集[20]。

7 利用 MALDI-TOF-MSI 技术观察 Mt 联合 Bb 对 db/db 小鼠脑组织中分子量 80 ~ 1 000 Da 的小分子含量的影响

行为学实验结束后,参考刘会会等[21]的方法进行 MALDI-TOF-MSI 实验。用 10% 水合氯醛麻醉小鼠,摘取小鼠脑组织液氮速冻,使用 CM1950 型冷冻切片机切片,切片厚度 10 μm,制备冠状脑片,采用融表法将组织切片转移至铟锡氧化物(idium tin oxide,ITO)载玻片上,采用纳米喷雾加湿器,将配制好的 1,5-DAN 盐酸盐基质溶液均匀喷涂在脑切片上,将切片放入惠普扫描仪中扫描。采用德国 Bruker Daltonics 公司的 MALDI-TOF-MSI 成像系统,在负离子模式下采集质谱数据。

8 统计学分析

实验结果用($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异比较使用 One-way ANOVA 分析,所有数据采用 GraphPad Prism 8 软件分析。MSI 实验结果使用 SciLS Lab 软件计算分子在各脑区分布的平均密度比值(intensity ratio),$P < 0.05$ 为统计学上有显著性差异。实验进行路线见图 2。

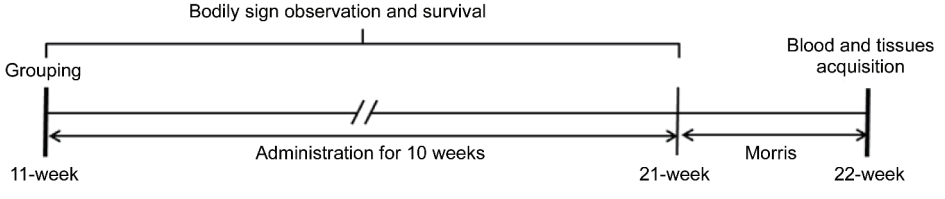
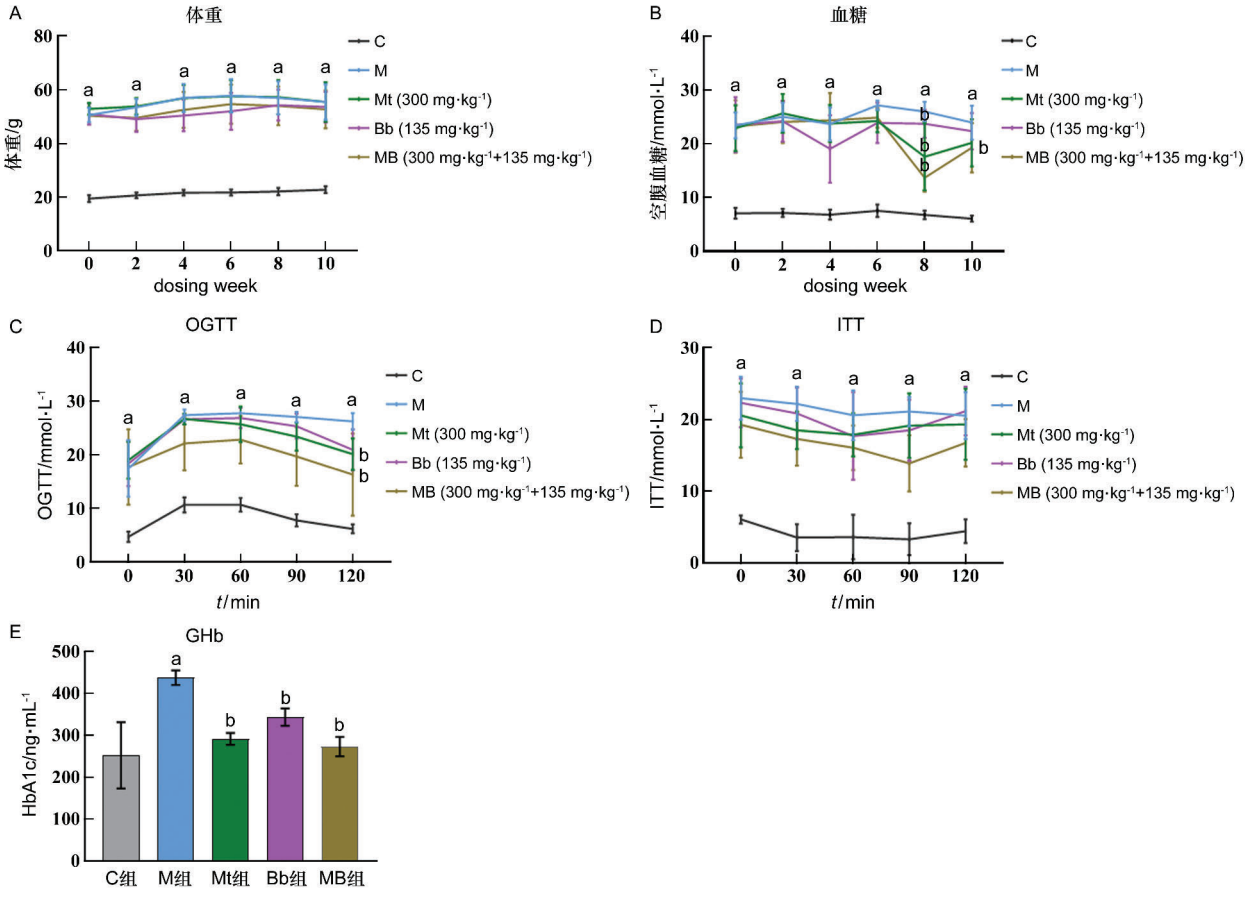


图 2 实验进行时间轴

结　果

1 Mt 联合 Bb 给药对 db/db 小鼠体重、血糖及糖耐量等相关指标的影响

在 10 周给药过程中,M,Mt,Bb,MB 组小鼠对比 C 组小鼠体重均明显升高;Mt,Bb 和 MB 组小鼠对比 M 组小鼠没有显著性差异,见图 3A。和 M 组小鼠比较,MB(第 8 周后 $P < 0.01$)组小鼠空腹血糖值明显低于 M 组,且明显低于 Mt(第 8 周后 $P < 0.01$)和 Bb(第 8 周后 $P < 0.01$)组小鼠空腹血糖值见图 3B。服用葡萄糖约 30 min 后,各组小鼠血糖值达最高峰,C 组小鼠血糖在 2 h 内降到正常水平;M 组小鼠血糖高峰期延迟,耐糖功能下降;Mt 和 MB 组小鼠 2 h 内血糖值降低水平明显强于 M 组(两者 $P < 0.01$),见图 3C;Bb 组小鼠血糖值也可见降低,但没有显著性差异。颈皮下注射胰岛素后,M 组小鼠胰岛素抵抗现象明显,Bb,Mt 和 MB 组小鼠胰岛素抵抗现象有所改善,但没有显著性差异,见图 3D。和 M 组小鼠比较,MB,Mt 和 Bb 组小鼠血清 HbA1c 水平明显降低(三者 $P < 0.01$),见图 3E。

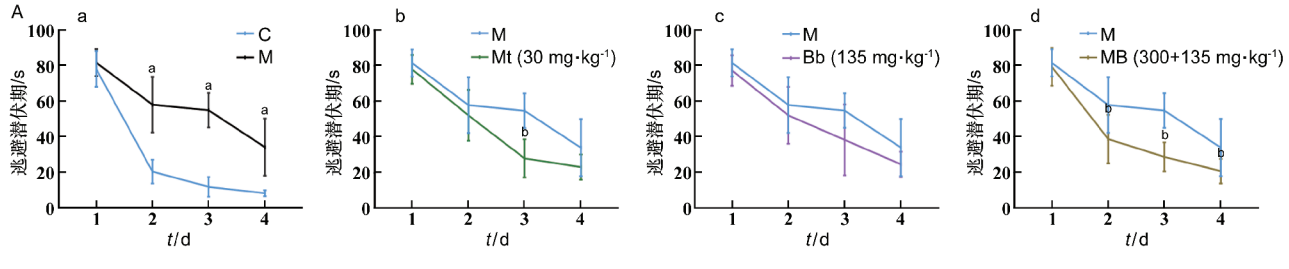


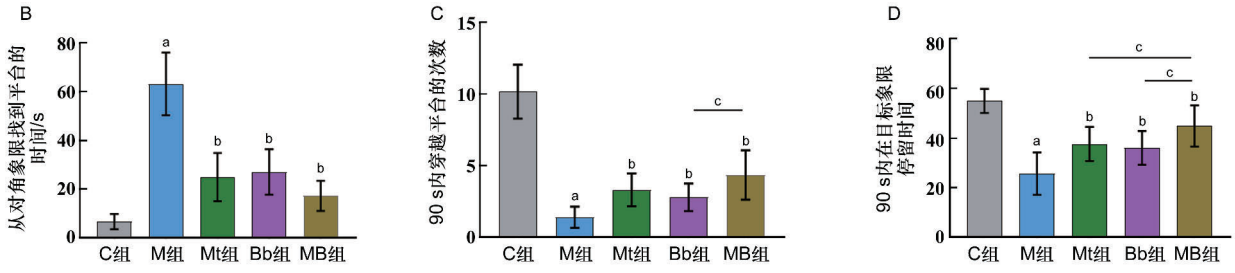
与空白对照组比较,a:$P<0.01$;与模型组比较,b:$P<0.01$

图 3 Mt 联合 Bb 对 db/db 小鼠体重、血糖及糖耐量等相关指标的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

2 Mt 联合 Bb 给药对 db/db 小鼠学习和空间记忆能力的影响

采用 Morris 水迷宫实验测定小鼠行为学结果显示:在定位航行实验中,M 组小鼠 d 2,d 3,d 4 的逃避潜伏期明显长于 C 组(d 3 $P<0.01$);和 M 组小鼠比较,MB 组小鼠逃避潜伏期明显减少(d 2 $P<0.01$,d 3 $P<0.01$,d 4 $P<0.05$),Mt 组小鼠(d 3 $P<0.01$,d 4 $P<0.05$)逃避潜伏期减少,Bb 组小鼠逃避潜伏期也有减少趋势但没有统计学差异,见图 4A。在空间探索实验中,M 组小鼠从对角象限找到平台的时间显著长于 C 组,MB,Bb 和 Mt 组小鼠找到平台时间明显缩短(三者 $P<0.01$),见图 4B。在 90 s 内,M 组小鼠穿过原平台所在位置的次数明显少于 C 组,Bb 组($P<0.01$)、Mt 和 MB 组(两者 $P<0.01$)组小鼠找到次数明显增多且 MB 组小鼠找到平台次数增多较 Bb 组更明显,见图 4C。在 90 s 内,M 组小鼠在原平台所在象限停留时间明显低于 C 组,MB 组($P<0.01$)、Mt 和 Bb(两者 $P<0.01$)组小鼠停留时间明显长于 M 组且 MB 组小鼠停留时间明显长于 Bb 和 Mt 组,见图 4D。



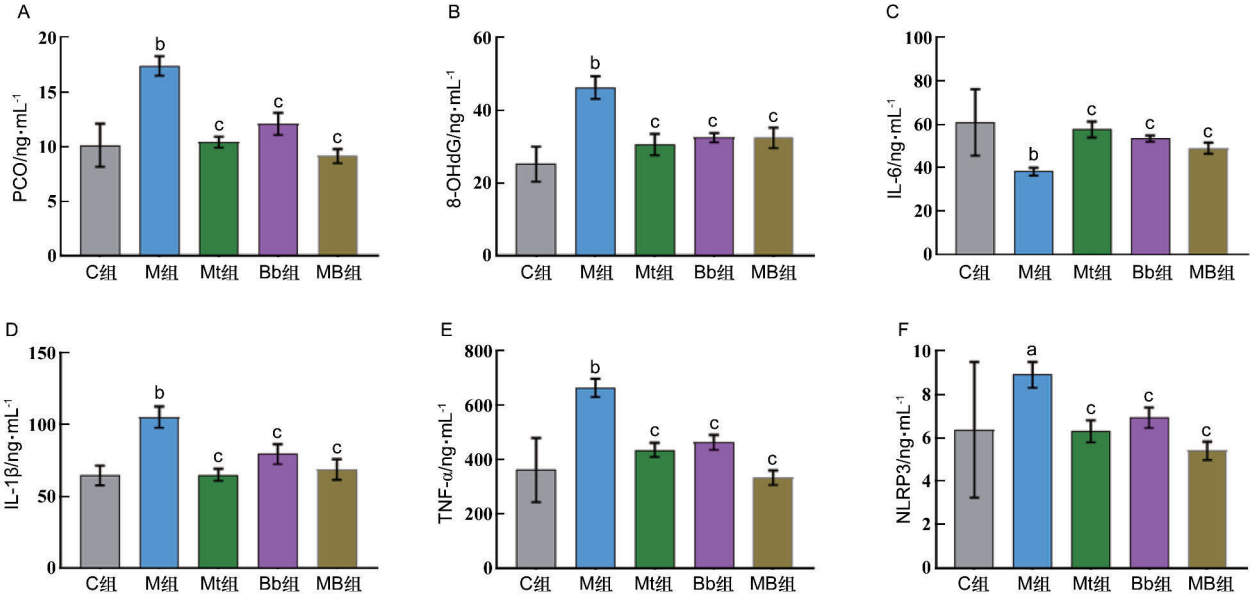


与空白对照组对比，a：$P<0.01$；与模型组比较，b：$P<0.01$；MB 组与 Mt/Bb 组比较，c：$P<0.05$

图 4 Mt 联合 Bb 给药对 db/db 小鼠认知能力的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

3 Mt 联合 Bb 给药对 db/db 小鼠氧化应激和炎症因子相关指标的影响

采用 ELISA 法测定小鼠血清氧化应激和炎症因子相关指标结果显示，M 组小鼠 PCO 和 8-OHdG 水平明显高于 C 组；和 M 组小鼠氧化应激水平比较，MB，Mt 和 Bb 组小鼠 PCO（三者 $P<0.01$）和 8-OHdG（三者 $P<0.01$）水平明显降低，见图 5A 和 B。M 组小鼠 IL-6 水平明显低于 C 组，IL-1β，TNF-α 和 NLRP3 水平明显高于 C 组；和 M 组小鼠炎症因子水平比较，Mt，Bb 和 MB 组小鼠 IL-6（三者 $P<01$，图 5C）水平明显升高，IL-1β（三者 $P<0.01$，图 5D），TNF-α（三者 $P<0.01$ 图 5E）和 NLRP3（三者 $P<0.01$ 图 5F）水平明显降低。但是在 ELISA 实验中，MB 组小鼠对比 Mt 和 Bb 组小鼠间外周血清氧化应激和炎症因子水平没有显著性差异。

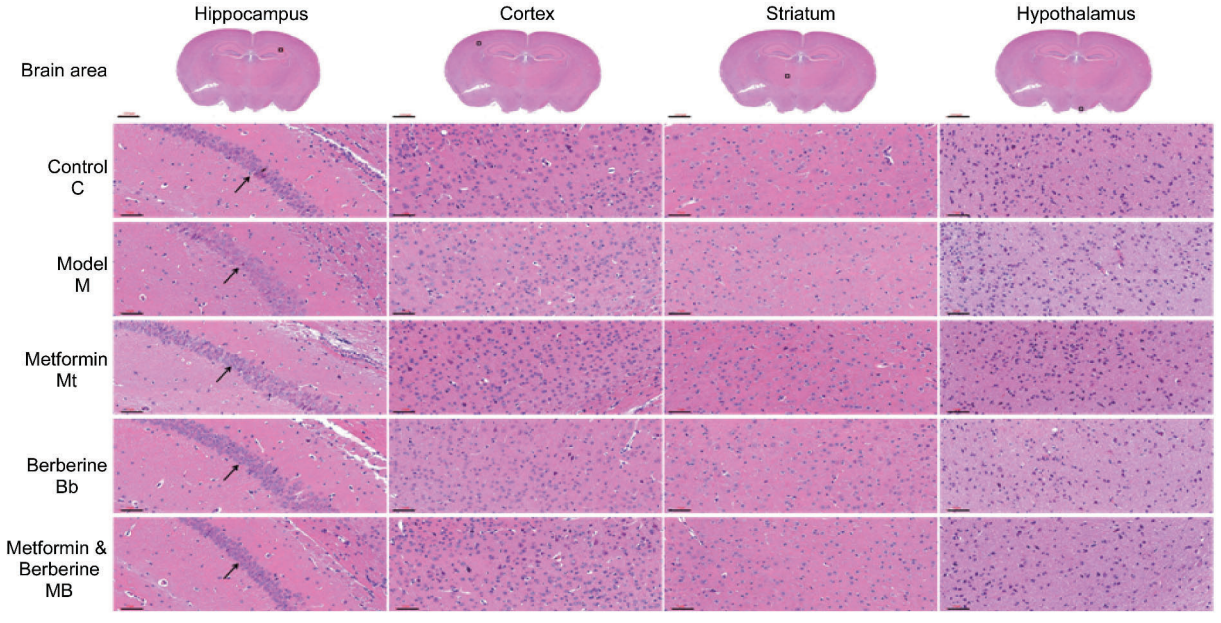


与空白对照组比较，a：$P<0.05$，b：$P<0.01$；与模型组比较，c：$P<0.01$

图 5 Mt 联合 Bb 给药对 db/db 小鼠氧化应激和炎症因子水平的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

4 Mt 联合 Bb 给药对小鼠脑组织细胞形态的影响

HE 染色结果表明，C 组小鼠脑海马区细胞整齐紧密排列，细胞间界限清楚，细胞形态完整，细胞核染色清晰，核呈圆形或椭圆形；M 组小鼠脑海马区细胞层次紊乱，排列稀疏不规则，细胞间隙变大，核仁不清晰，部分细胞呈现空泡状；MB，Bb 和 Mt 组小鼠脑海马区细胞排列较整齐，核固缩细胞增多。皮层和纹状体 C 组小鼠脑细胞染色清晰，细胞核明显；M 组小鼠脑细胞多呈空泡状，细胞着色较浅；MB，Mt 和 Bb 组小鼠脑细胞染色较清晰，同一放大倍数视野区域下空泡状细胞减少。下丘脑区域各组小鼠脑细胞形态未见明显区别（图 6）。

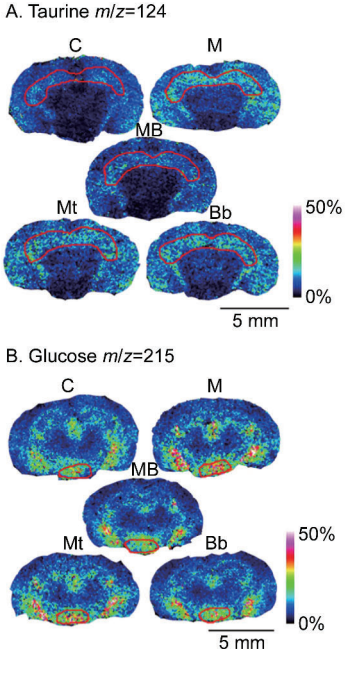


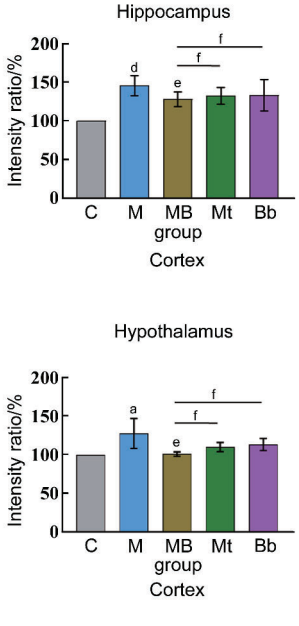
空白对照组(Control,C);模型组(Model,M);二甲双胍给药组(Mt,300 mg·kg^{-1});小檗碱给药组(Bb,135 mg·kg^{-1});二甲双胍联合小檗碱给药组(MB,300 mg·kg^{-1} + 135 mg·kg^{-1});整脑图片标尺为 1 000 μm,其他标尺为 50 μm

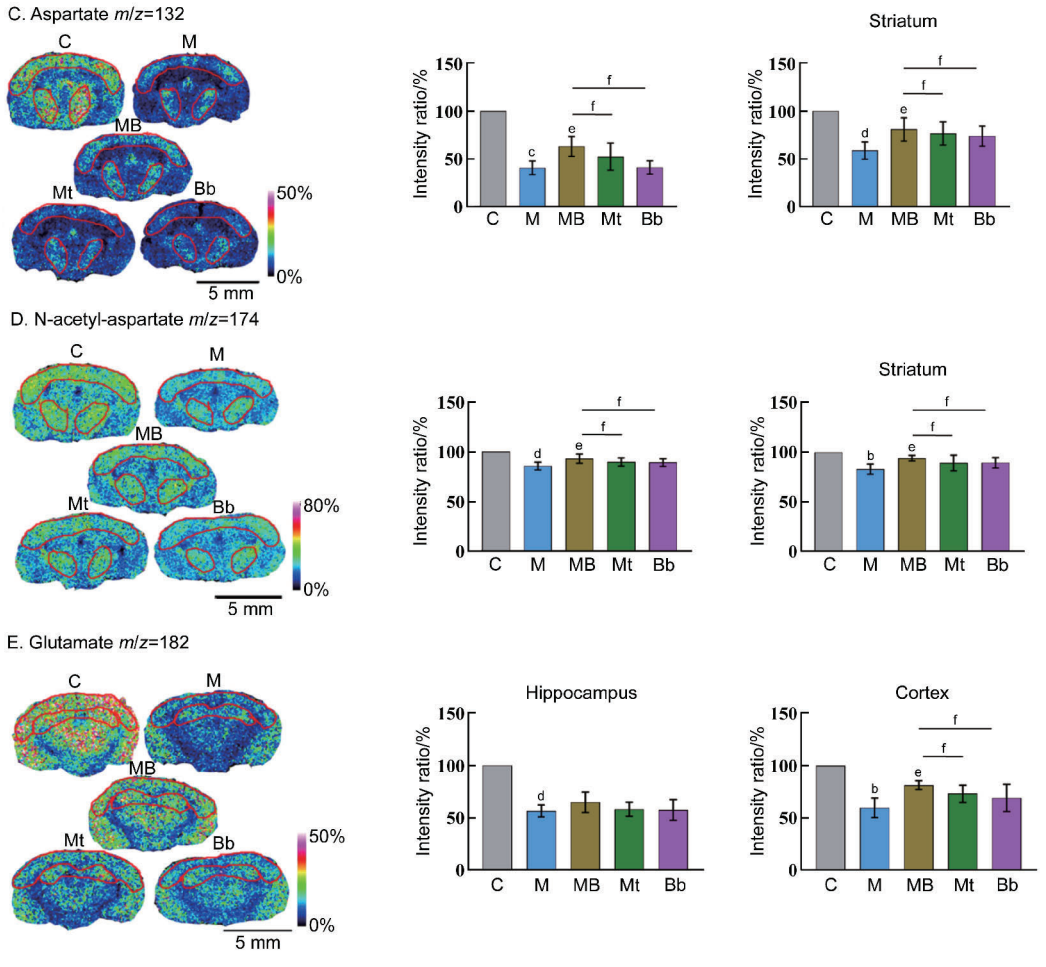
图 6 Mt 联合 Bb 对 db/db 小鼠不同脑区神经细胞形态的影响(200 ×,n = 3)

5 采用 MALDI-TOF-MSI 技术观察 Mt 联合 Bb 给药对 db/db 小鼠脑组织中分子量介于 80 ~ 1 000 Da 的小分子含量的影响

通过 MALDI-TOF-MSI 技术对 db/db 小鼠脑组织冠状面冰冻切片成像。发现 M 组小鼠脑海马中的牛磺酸(taurine, Tau,图 7A)、下丘脑的葡萄糖(glucose, Glc,图 7B)含量显著高于 C 组;皮层和纹状体的天冬氨酸(aspartate, Asp,图 7C)和 *N*-乙酰天冬氨酸(*N*-acetyl-aspartate,NAA,图 7D)、皮层和海马的谷氨酸(glutamate, Glu,图 7E)的含量显著低于 C 组。和 M 组小鼠比较,MB,Mt 和 Bb 组小鼠脑组织中的 Tau 和 Glc 含量降低,Mt 和 Bb 组没有显著性差异,MB 组降低水平明显(P < 0.05);Mt,Bb 和 MB 组小鼠 Asp,NAA 和 Glu 的含量提升,Mt 和 Bb 组没有显著性差异,MB 组提升水平明显(P < 0.05)。







A:Tau;B:Glc;C:Asp;D:NAA;E:Glu;与空白对照组比较,a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,c:$P<0.001$,d:$P<0.0001$;与模型组比较,e:$P<0.05$;MB 组与 Mt/Bb 组比较,f:$P<0.05$

图 7 db/db 小鼠脑组织冠状面冰冻切片中部分小分子含量和分布($\bar{x}\pm s$,$n=5$)

讨　论

WHO 的数据表明,全球糖尿病患者高达 4.22 亿。研究表明,高血糖、胰岛素抵抗、炎症、氧化应激等均会影响认知功能,故糖尿病患者发生认知功能障碍、痴呆等中枢神经系统疾病的概率要明显高于正常人,且糖尿病也是阿尔茨海默病的独立危险因素[22]。糖尿病引发的认知功能障碍严重影响了患者及其亲人的生活质量,极大增加了社会医疗负担,因此,对糖尿病认知功能障碍的研究具有重要意义。

Mt 是国际糖尿病指南中明确推荐使用的作为 T2DM 患者首选的一线降糖药物。目前已有很多报道证明了 Mt 对改善糖尿病患者认知功能障碍也有良好的疗效,但是这些实验结果集中在临床研究中对糖尿病患者使用 Mt 后的疗效分析或 Meta 分析,缺少系统的动物实验及其作用机制的研究结果[23-24]。而 Bb 则可以使胰岛素表达增加、胰岛 B 细胞再生及抗氧化作用[25-26],因此,Bb 对糖尿病的改善作用是毋庸置疑的。除此之外,近期研究表明 Bb 还具有抗炎、抗精神病、抗抑郁和抗遗忘作用[27],可以保护神经元免受各种损伤[28]。目前已有研究明确了 Bb 对糖尿病认知功能障碍的保护作用,研究以大脑皮层和海马中的脂质过氧化和谷胱甘肽水平作为氧化应激评价参数,胆碱酯酶(ChE)活性作为胆碱能功能评价指标发现 Bb 可以通过减少脂质过氧化、提高谷胱甘肽水平、降低 ChE 活性来改善链脲佐菌霉素诱导的糖尿病大鼠(STZ rats)认知功能障碍;另有研究表明 Bb 也可以通过沉默信息调节因子 2 相关酶 1(SIRT1)/内质网(ER)通路改善糖尿病认知功能障碍。本实验首次将 Mt 和 Bb 联合使用,在系统的动物实验研究中发现两药联用比单独使用 Mt 或 Bb 对糖尿病认知功

能障碍保护作用更明显。

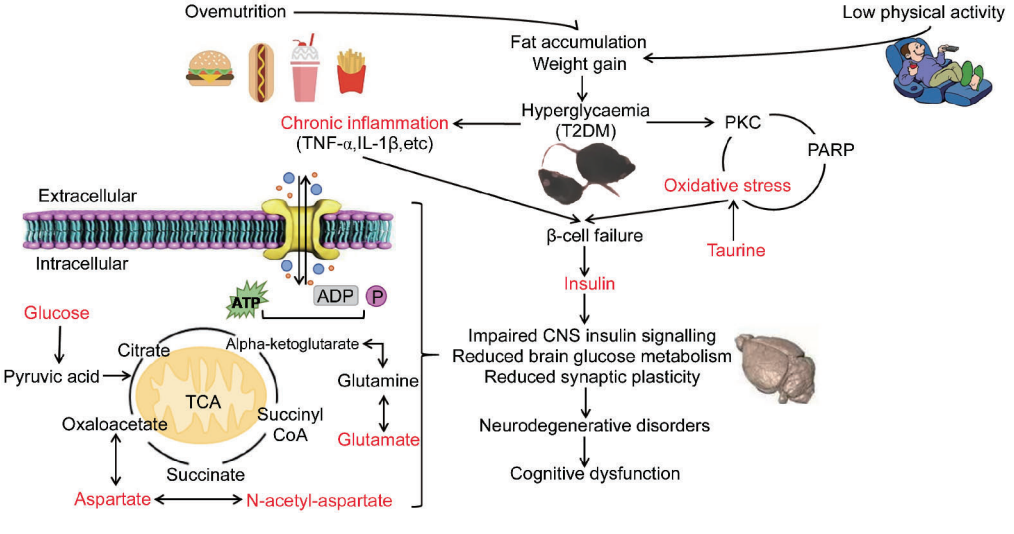
Mt 联合 Bb 给药对 db/db 小鼠的体重没有明显影响,其降血糖的效果比 Mt 或 Bb 单独给药更明显。在 ITT 实验中虽没有发现显著差异,但结果曲线显示两药联用对胰岛素抵抗现象的改善较单用一种药物更明显。

学习能力和记忆能力是认知功能的 2 个元素[29],本实验采用了经典的 Morris 水迷宫实验来评价小鼠学习记忆能力。实验分为定位航行实验和空间探索实验两大部分,定位航行实验主要用来评价小鼠对空间的学习能力,空间探索实验主要用来评价小鼠对空间的记忆能力。本实验首次在水迷宫实验中发现 Mt 联合 Bb 使用对小鼠认知能力的改善效果明显。

用 ELISA 法测定外周血清中氧化应激和炎症因子指标中发现 Mt 和 Bb 联用可以十分显著的改善 db/db 小鼠外周血清中的氧化应激和炎症反应情况,但是因为单独使用 Mt 或 Bb 也可以产生相同的疗效,所以暂时并不能确定 2 种药物对氧化应激和炎症因子指标的影响是否叠加或协同。进一步的研究或可考虑检测两药联用对中枢神经系统氧化应激和炎症反应的作用效果。

海马区是主要负责学习和记忆的脑区[30],海马对于血糖十分敏感,HE 染色结果显示了小鼠海马区 M 组神经细胞受损严重,Mt 和 Bb 组有所改善,而 MB 组两药联用对神经细胞的保护作用最明显。除此以外,顶叶皮层皮质部分对认知功能尤其是空间认知能力有重要调节作用[31];纹状体系大脑基底神经节之一,也是锥体外系的组成部分,接受大脑皮质和丘脑的纤维,再发出纤维进入丘脑底部,此脑区对于调节各种复杂运动以及空间记忆能力有着重要作用[32];下丘脑是调节内分泌及各种代谢活动的神经中枢,是调控血糖平衡的重要脑区[33]。本实验首次使用 MALDI-TOF-MSI 技术来检测糖尿病认知功能障碍小鼠脑组织,利用 MALDI-TOF-MSI 技术“可以同时定位定量观察多个分子”的特点,检测了脑组织冠状面冰冻切片中分子量 80 ~ 1 000 Da 的小分子的含量及分布。结果显示糖尿病认知功能障碍小鼠脑内 Glc 主要堆积在负责血糖平衡的下丘脑部位,我们推测 M 组小鼠可能下丘脑功能出现障碍,导致对于血糖平衡的调节能力减弱,两药联用后下丘脑部位的葡萄糖积聚明显减少;皮层和海马区中的 TCA 相关小分子 Glu 含量减少,这与已有的 T2DM 患者认知功能障碍 Glu 水平低下的报道一致[34],皮层和纹状体部位的 TCA 循环相关小分子 Asp 和 NAA 含量减少,由此可见糖尿病认知功能障碍小鼠学习和空间记忆相关脑区的 TCA 循环功能下降,这和文献[35]报道也是一致的。我们首次发现两药联用后,db/db 小鼠脑组织中的 Glu,Asp 和 NAA 含量恢复,TCA 循环功能明显改善;另外,Asp 和 NAA 是典型的兴奋性神经递质,它们水平的降低或许和糖尿病认知功能障碍神经元活力和突触活性降低有关。综合 MSI 实验结果显示,Mt 和 Bb 联用可以显著改善这些小分子在其分布脑区的含量异常。

图 8 是糖尿病认知功能障碍发生过程及药物干预环节的总结图。



红字:本实验检测指标

图 8 糖尿病认知功能障碍发生过程及药物的干预环节

营养过剩或缺乏运动等造成脂肪堆积,体重、血糖升高引发 T2DM,T2DM 患者体内炎症反应和氧化应激水平升高,胰岛 β 细胞和胰岛素受体(insulin receptor,IR)功能障碍导致胰岛素分泌、传导异常,中枢神经系统胰岛素信号传导受损、糖代谢紊乱、突触可塑性降低、线粒体内 TCA 和 ATP 循环等能量代谢通路异常,最终导致神经退行性疾病——糖尿病认知功能障碍的发生,红色字体部分所示则为本实验中检测的 Mt 联合 Bb 给药对糖尿病认知功能障碍产生影响的因子。

综上所述,本实验结果:db/db 小鼠在 20 周左右会出现较为明显的认知功能障碍,和前文所述文献报道一致;糖尿病治疗的一线药物 Mt 对糖尿病患者认知功能有较好的保护作用[36-37],在动物实验上我们证明了这一点。本实验首次将 Mt 和近期新发现的对糖尿病治疗有益且对神经元有保护作用的中药 Bb 联合使用,在水迷宫实验中发现两药联合使用对小鼠认知能力的改善效果更明显,该改善作用机制与其抗炎症、抗氧化应激、调节兴奋性神经递质、改善 TCA 循环等作用有关;本实验首次采用 MALDI-TOF-MSI 技术更加准确地定位 db/db 小鼠脑区中与糖尿病认知功能障碍相关的部位及部分小分子相对含量。本实验为糖尿病认知功能障碍药物治疗的研究提供了新的研究思路和技术,在未来的研究中可以对其作用机制进行深入探究,希望为糖尿病认知功能障碍患者带来福音。

[参 考 文 献]

[1] MÜHLHÄUSLER BS, TOOP C, GENTILI S. Nutritional models of type 2 diabetes mellitus[J]. *Methods Mol Biol Clifton N J*, 2020, 2076: 43-69.

[2] 童航,蒋荣荣,祝红达,等. 糖尿病中药制剂的知识产权分析[J]. 今日药学,2021,31(2):140-142.

[3] 张敏杰,方翼. rhGLP-1(7-36)对糖尿病肾病大鼠肾脏的保护机制研究[J]. 中国现代应用药学,2021,38(3):281-285.

[4] LIU Y, LI M, ZHANG Z, *et al*. Role of microglia-neuron interactions in diabetic encephalopathy[J]. *Ageing Res Rev*, 2018, 42: 28-39.

[5] BIESSELS GJ, DESPA F. Cognitive decline and dementia in diabetes mellitus: mechanisms and clinical implications[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2018, 14(10): 591-604.

[6] MUNSHI MN. Cognitive dysfunction in older adults with diabetes: What a clinician needs to know[J]. *Diabetes Care*, 2017, 40(4): 461-467.

[7] YERMAKOV LM, GRIGGS RB, DROUET DE, *et al*. Impairment of cognitive flexibility in type 2 diabetic db/db mice[J]. *Behav Brain Res*, 2019, 371: 111978.

[8] LUCHSINGER JA, PEREZ T, CHANG H, *et al*. Metformin in amnestic mild cognitive impairment: results of a pilot randomized placebo controlled clinical trial[J]. *J Alzheimers Dis*, 2016, 51(2): 501-514.

[9] LENNOX R, PORTER DW, FLATT PR, *et al*. Comparison of the independent and combined effects of sub-chronic therapy with metformin and a stable GLP-1 receptor agonist on cognitive function, hippocampal synaptic plasticity and metabolic control in high-fat fed mice[J]. *Neuropharmacology*, 2014, 86: 22-30.

[10] LI HY, WANG XC, XU YM, *et al*. Berberine improves diabetic encephalopathy through the SIRT1/ER stress pathway in db/db mice[J]. *Rejuvenation Res*, 2018, 21(3): 200-209.

[11] 范晨,李颖,宋含平,等. 小檗碱片联合二甲双胍治疗 2 型糖尿病效果评价[J]. 现代医院,2018,18(5): 731-733.

[12] 董坤伦,尚军洁,陶磊. 小檗碱联合二甲双胍对 2 型糖尿病血清炎症因子及胰岛功能的影响[J]. 临床与病理杂志,2017,37(7): 1418-1422.

[13] LEFCOSKI S, KEW K, REECE S, *et al*. Anatomical-molecular distribution of EphrinA1 in infarcted mouse heart using MALDI mass spectrometry imaging[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2018, 29(3): 527-534.

[14] 王巍嵩,徐智宇,赵国伟,等. 二甲双胍改善 db/db 小鼠胰岛素抵抗新机制-抑制 PPARγ273 位磷酸化[J]. 解放军药学学报,2015,31(6): 469-472, 480.

[15] CHEN JL, LUO C, PU D, *et al*. Metformin attenuates diabetes-induced tau hyperphosphorylation *in vitro* and *in vivo* by enhancing autophagic clearance[J]. *Exp Neurol*, 2019, 311: 44-56.

[16] CHANPRASERTPINYO W, BHIROMMUANG N, SURAWATTANAWISET T, *et al*. Using ice cream for diagnosis of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance: an alternative to the oral glucose tolerance test[J]. *Am J Med Sci*, 2017, 354(6): 581-585.

[17] NUNEZ J. Morris water maze experiment[J]. *J Vis Exp*, 2008, (19): e897.

[18] KARAM BS, CHAVEZ-MORENO A, KOH W, *et al*. Oxidative stress and inflammation as central mediators of atrial fibrillation in obesity and diabetes[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2017, 16(1): 120.

[19] CHEN KY, WANG N, DIAO YG, *et al*. Hydrogen-rich saline attenuates brain injury induced by cardiopulmonary bypass and inhibits microvascular endothelial cell apoptosis via the PI3K/Akt/GSK3β signaling pathway in rats[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(4): 1634-1647.

[20] LIU HH, CHEN R, WANG JY, *et al*. 1, 5-diaminonaphthalene hydrochloride assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging of small molecules in tissues following focal cerebral ischemia[J]. *Anal Chem*, 2014, 86(20): 10114-10121.

[21] YUAN J, TAN JTM, TAN JTM, *et al*. Fenofibrate rescues diabetes-related impairment of ischemia-mediated angiogenesis by PPARα-independent modulation of thioredoxin-interacting protein[J]. *Diabetes*, 2019, 68(5): 1040-1053.

[22] LICCINI A, MALMSTROM TK, MORLEY JE. Metformin use and cognitive dysfunction among patients with diabetes mellitus[J]. *J Am Med Dir Assoc*, 2016, 17(11): 1063-1065.

[23] GUO M, MI J, JIANG QM, *et al*. Metformin may produce antidepressant effects through improvement of cognitive function among depressed patients with diabetes mellitus[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2014, 41(9): 650-656.

[24] NG TP, FENG L, YAP KB, *et al*. Long-term metformin usage and cognitive function among older adults with diabetes[J]. *J Alzheimer's Dis*, 2014, 41(1): 61-68.

[25] ZHOU J, ZHOU S, TANG J, *et al*. Protective effect of berberine on beta cells in streptozotocin-and high-carbohydrate/high-fat diet-induced diabetic rats[J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 606(1-3): 262-268.

[26] KONG WJ, ZHANG H, SONG DQ, *et al*. Berberine reduces insulin resistance through protein kinase C-dependent up-regulation of insulin receptor expression[J]. *Metabolism*, 2009, 58(1): 109-119.

[27] KULKARNI SK, DHIR A. On the mechanism of antidepressant-like action of berberine chloride[J]. *Eur J Pharmacol*, 2008,

589(1 – 3): 163 – 172.
[28] KULKARNI SK, DHIR A. Berberine: a plant alkaloid with therapeutic potential for central nervous system disorders[J]. *Phytother Res*, 2010, 24(3): 317 – 324.
[29] SASE A, DAHANAYAKA S, HÖGER H, *et al*. Changes of hippocampal beta-alanine and citrulline levels are paralleling early and late phase of retrieval in the Morris Water Maze[J]. *Behav Brain Res*, 2013, 249: 104 – 108.
[30] JAIN S, LAFRANCOIS JJ, BOTTERILL JJ, *et al*. Adult neurogenesis in the mouse dentate gyrus protects the Hippocampus from neuronal injury following severe seizures[J]. *Hippocampus*, 2019, 29(8): 683 – 709.
[31] SACK AT. Parietal cortex and spatial cognition[J]. *Behav Brain Res*, 2009, 202(2): 153 – 161.
[32] MÉNDEZ-COUZ M, CONEJO NM, GONZÁLEZ-PARDO H, *et al*. Functional interactions between dentate gyrus, striatum and anterior thalamic nuclei on spatial memory retrieval[J]. *Brain Res*, 2015, 1605: 59 – 69.
[33] ZHANG YL, REICHEL JM, HAN C, *et al*. Astrocytic process plasticity and IKKβ/NF-κB in central control of blood glucose, blood pressure, and body weight[J]. *Cell Metab*, 2017, 25(5): 1091 – 1102.
[34] VAN BUSSEL FC, BACKES WH, HOFMAN PA, *et al*. Increased GABA concentrations in type 2 diabetes mellitus are related to lower cognitive functioning[J]. *Medicine* (*Baltimore*), 2016, 95(36): e4803.
[35] TYAGI A, NGUYEN CU, CHONG T, *et al*. SIRT3 deficiency-induced mitochondrial dysfunction and inflammasome formation in the brain[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 17547.
[36] CAMPBELL JM, STEPHENSON MD, DE COURTEN B, *et al*. Metformin use associated with reduced risk of dementia in patients with diabetes: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Alzheimers Dis*, 2018, 65(4): 1225 – 1236.
[37] DITACCHIO KA, HEINEMANN SF, DZIEWCZAPOLSKI G. Metformin treatment alters memory function in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *J Alzheimers Dis*, 2015, 44(1): 43 – 48.

编辑:刘卓越/接受日期:2020 – 05 – 20